



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

ESTUDI FTIR DE MINERALS QUELATS PER A SUPLEMENTS ALIMENTICIS

Treball final de grau
Enginyeria Alimentària

Autor: Albert Ginés Bagué

Tutors: Francisco Luis Sepulcre Sánchez

Xavier Sáez i Lorente

22 / Desembre / 2016

Resum

Els minerals aminoàcids quelats són importants en la indústria alimentària i a la de suplementes alimentaris. Això és degut a la elevada biodisponibilitat que tenen els minerals un cop són absorbits al cos, respecte altre tipus de sals orgàniques e inorgàniques.

Amb l'objectiu de caracteritzar i interpretar quelats minerals, es van dissenyar experimentalment cristalls de glicina, i quelats de glicina amb zinc i ferro a diferents pH (àcid i zwitterió). Per així, amb l'ajut de la espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier (FTIR), estudiar l'estat de protonació dels grups amino i carboxil presents en la glicina i la glicina en forma quelada (amb ferro i zinc).

En la interpretació del cristall de ferro amb la glicina, ha donat com a resultat que el catió es troba unit amb el carboxil, en canvi el zinc es troba unit juntament amb l'amino i el carboxil de la glicina. Tot això provoca que la caracterització estructural d'ambdós cations junt amb la glicina no sigui la mateixa.

Per a realitzar-ho, s'ha utilitzat un espectrofotòmetre FTIR de la companyia Agilent, model Cary 630 i un accessori d'ATR de vidre de diamant. Les condicions espectrals es varen fixar en 64 passades en el rang de 400 a 4000 cm^{-1} i de 400 a 1800 cm^{-1} i amb una resolució de 4 cm^{-1} .

Paraules clau: Zwitterió, FTIR, mineral, grups amino i carboxil.

Resumen

Los minerales quelados aminoácidos tienen un peso importante en la industria alimentaria y la de suplementos alimenticios. Esto es debido a la elevada biodisponibilidad que tienen los minerales una vez son absorbidos por el cuerpo, respecto a otras sales orgánicas e inorgánicas.

Con el objetivo de caracterizar e interpretar minerales quelados, se diseñaron de forma experimental cristales de glicina y quelados de glicina con hierro o zinc a diferentes pH (ácido y zwitterión). Para así, con la ayuda de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), estudiar el estado de protonación de los grupos amino y carboxilo presentes en la glicina y en la glicina en forma de quelados (con hierro y zinc).

En la interpretación del cristal hierro junto con la glicina, ha resultado que el catión se encuentra unido en el carboxilo. Sin embargo, el catión zinc se encuentra enlazado junto con el amino y el carboxilo de la glicina. Todo esto provoca que la caracterización estructural de los dos cationes en el mineral quelado no sea la misma.

Para llevarlo a cabo, se usó un espectrofotómetro FTIR de la compañía Agilent, modelo Cary 630, con un accesorio de ATR de vidrio de diamante. Las condiciones espectrales se fijaron en 64 barridos, en rango 400 a 4000 cm^{-1} y de 400 a 1800 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

Palabras clave: Zwitterió, FTIR, mineral, grupos amino y carboxilo.

Abstract

Amino acids chelate minerals are important in food industry and alimentary supplements industry due to the large bioavailability that they have once absorbed by the body than other organic and inorganic salts.

With the aim of characterize and interpret minerals chelates it has been designed experimentally crystal grown of salts of glycine and mineral chelates from zinc and iron with different pH (acid, zwitterion and alkaline) and analyze the protonation state of the amino acid carboxyl groups that there are in glycine an chelated form of glycine (with iron and zinc) by Fourier transform infrared spectrometry.

In the results appear that the mineral chelate with iron as cation is coupled with the carboxyl group of glycine. However, zinc is coupled with both groups of glycine (amino and carboxyl groups). For instance, the structural characterizations of both cations with glycine are not the same.

For the experiment it has been used an spectrophotometer FTIR from Agilent enterprise, Cary 630 model and a diamond glass ATR accessory. The spectral conditions are: 64 backgrounds in a range from 400 to 4000 cm^{-1} and from 400 to 1800 cm^{-1} with a 4 cm^{-1} resolution.

Keywords: Zwitterion, FTIR, mineral, amino and carboxyl group.

Sumari

1. Introducció.....	11
2. Antecedents.....	12
2.1. Els rols dels minerals i el seu ús en la indústria alimentària.....	12
2.2. Suplementació mineral.....	13
2.2.1. Sals minerals inorgàniques	13
2.2.2. Minerals microencapsulats.....	13
2.2.3. Minerals aminoacids quelats	15
2.2.3.1. Mètode d'identificació dels minerals quelats aminoacids.	17
2.3. Característiques de la glicina	18
3. Objectius.....	19
4. Materials i mètodes	20
4.1. Materials.....	20
4.1.1. Productes.....	20
4.1.1.1. Glicina	20
4.1.1.2. Sulfat de ferro (II) heptahidrat.....	20
4.1.1.3. Zinc sulfat monohidrat.....	21
4.1.1.4. Hidròxid de sodi (NaOH)	21
4.1.1.5. Àcid cítric	21
4.1.1.6. Àcid Clorhídric.....	22
4.1.1.7. Aminoacids quelats comercials	22
4.1.2. Analítics	23
4.1.2.1. FT-IR	23
4.1.2.1.1. Modes de vibració	26
4.1.2.1.2. Tipus de vibracions	26
4.1.2.1.3. Interpretació d'un espectre	28
4.1.2.1.4. Accessori de mostreig d'ATR de vidre de diamant	28
4.1.3. Preparació de mostres.....	30
4.2. Mètodes.....	32
4.2.1. Disseny.....	32
4.2.1.1. Procediment per obtenir cristalls	32
4.2.1.2. Recuperació del cristall.....	33
4.2.1.3. Mètodes per analitzar l'espectre.....	35
4.2.1.3.1. Neteja de l'accessori d'ATR per a preparar l'anàlisi	35
4.2.1.3.2. Recopilació d'un espectre de mostra	35
5. Resultats i discussió.....	37
5.1. Obtenció de cristalls	39
5.1.1. Cristalls de glicina	39
5.1.2. Quelats de glicina amb ferro	40
5.1.3. Quelats de glicina amb zinc	41
5.2. Interpretació de resultats	42
5.2.1. Representació dels espectres de la glicina	42
5.2.2. Espectres de glicina	44
5.2.2.1. Interpretació dels espectres de la glicina.	45
5.2.3. Quelat de glicina amb ferro.....	48
5.2.3.1. Interpretació de l'espectre del quelat de glicina amb ferro.....	50
5.2.4. Quelat de glicina amb zinc.....	54

5.2.4.1. Interpretació de l'espectre del quelat de glicina amb zinc.....	56
5.3. Discussió entre un quelat de glicina amb ferro i zinc	60
6. Conclusions.....	63
Bibliografia.....	64

Índex de figures

Figura 2.1 Gràfica del procés de microencapsulació d'una substància. Font: (Oldewage-Theron et al. 2002).....	14
Figura 2.2 Gràfica de resultat entre sulfat de ferro i ferro microencapsulat. Font: (Lázaro 2013)...	14
Figura 2.3 Dues possibles combinacions d'unió de la glicina amb el catió. Font: (Ai et al. 2005). ...	15
Figura 2.4 Gràfica que mostra l'absorció de ferro de dos compostos, sulfat de ferro a la dreta i bisglicinat de ferro a l'esquerra. Font: (Pineda et al. 2001).....	16
Figura 2.5 Mitjana de les concentracions de zinc en sèrum humà del compostos, gluconat de zinc i bisglicinat de zinc. Font: (Gandia et al. 2007).	17
Figura 2.6 Estructures moleculars de la glicina: a) glicina zwitterió, b) glicina neutre, c) glicina bàsica, d i e) glicina àcida (monòmer) i glicina àcida (dímer) respectivament. Font: (Rosado et al. 1998).	18
Figura 4.1 Aspecte del producte sulfat de ferro (II) heptahidrat. Font: pròpia.	20
Figura 4.2 Aspecte del producte zinc sulfat monohidrat. Font: pròpia.	21
Figura 4.3 Bisglicinat de ferro (esquerra) i bisglicinat de zinc (dreta) de la casa Albion. Font: pròpia.	22
Figura 4.4 Regió espectral de la radiació electromagnètica, amb una ampliació en la regió IR. Font: (Derrick 1999).....	23
Figura 4.5 Representació d'una ona electromagnètica. Font: (Stuart 2004).....	24
Figura 4.6 Nivells vibracionals d'energia d'una molècula. (Derrick 1999).	25
Figura 4.7 Diferents tipus de vibració de les molècules. Font: << http://www.ehu.es/imacris/PIE06/web/IR.htm >>	27
Figura 4.8 Exemple d'un espectre de FTIR de la glicina a pH 9,62. Font: pròpia.	28
Figura 4.9 Esquema de la tècnica de reflexió interna. Font: (Nicolet et al. 2001).	28
Figura 4.10 Exemple d'un mostreig amb l'aparell FT-IR. Font: pròpia.....	29
Figura 4.11 Agitador magnètic amb regulador de temperatura. Font: pròpia.	30
Figura 4.12 Sortida de N ₂ amb aixeta per regular el cabal. Font: pròpia.	31
Figura 4.13 Filtratge al buit amb embut Büchner i estris per el procés de neteja dels cristalls. Font: pròpia.	31
Figura 4.14 Forn a 40°C per extreure la humitat als cristalls. Font: pròpia.	32
Figura 4.15 Flascons amb els ingredients necessàries per a poder fer la reacció sota un agitador. Font: pròpia.....	32
Figura 4.16 Embut Büchner, part del procés per fer la neteja dels cristalls. Font: pròpia.	33
Figura 4.17 Cristall resultant de l'experiment (glicina amb ferro). Cada costat del quadrat fa 0,5cm. Font: pròpia.....	33

Figura 4.18 Esquema del procés d'obtenció de cristall de glicina i/o quelat de glicina amb ferro i zinc.	34
Figura 4.19 Premsa de la mostra d'accessori d'ATR de vidre de diamant en la posició més alta.....	35
Figura 4.20 Esquema resum del mètode d'anàlisi amb FT-IR. Font : pròpia i (Derrick 1999).....	36
Figura 5.1 Formes iòniques de la glicina segons el pH. Font: << http://themedicalbiochemistrypage.org/es/amino-acids-sp.php >>	38
Figura 5.2 Cristalls obtingut experimentalment de la glicina àcida (esquerra) i zwitterió (dreta). Font: pròpia.....	39
Figura 5.3 Cristalls obtinguts experimentalment del quelat de glicina amb ferro. Àcida: (esquerra) i zwitterió: (dreta). Font: pròpia.	40
Figura 5.4 Cristalls obtingut experimentalment del quelat de glicina amb zinc: àcida (esquerra) i zwitterió (dreta). Font: pròpia.....	41
Figura 5.5 Espectre de FTIR de la glicina a pH 3,03 que compren el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i entre 1800-500cm ⁻¹ (per l'estudi en específic de la zona).	42
Figura 5.6 Espectre de FTIR de la glicina a pH 6,20 que compren el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-500cm ⁻¹ (per l'estudi en específic de la zona).	43
Figura 5.7 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina àcida i zwitterió. En el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-400 cm ⁻¹ (per estudi en específic de la zona).....	46
Figura 5.8 Espectre de FTIR del quelat de glicina amb ferro a pH 3,03 que compren el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-500cm ⁻¹ (per l'estudi en específic de la zona).	48
Figura 5.9 Espectre de FTIR del quelat de glicina amb ferro a pH 5,89 que compren el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-500cm ⁻¹ (per l'estudi en específic de la zona).	49
Figura 5.10 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada de ferro àcida (FeBG) i de la glicina àcida (Gly). En el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-400 cm ⁻¹ (per estudi en específic de la zona).	50
Figura 5.11 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb ferro zwitterió (FeBG) respecte de la glicina zwitterió (Gly). En el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-400 cm ⁻¹ (per estudi en específic de la zona).	51
Figura 5.12 Estructura proposada per el mineral quelat de glicina amb ferro. Font: pròpia.	53
Figura 5.13 Espectre de FTIR del quelat de glicina amb zinc a pH 3,3 que compren el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-500cm ⁻¹ (per l'estudi en específic de la zona).....	54
Figura 5.14 Espectre de FTIR del quelat de glicina amb zinc a pH 6,58 que compren el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-500cm ⁻¹ (per l'estudi en específic de la zona).....	55
Figura 5.15 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb zinc (ZnBG) respecte la glicina àcida (Gly). En el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-400 cm ⁻¹ (per estudi en específic de la zona).	56
Figura 5.16 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb zinc zwitterió (ZnBG) respecte la glicina zwitterió (Gly). En el rang de 4000-400 cm ⁻¹ (representació general) i de 1800-400 cm ⁻¹ (per estudi en específic de la zona).	57

Figura 5.17 Estructura proposada pel mineral quelat de glicina amb zinc. Font: pròpia.	59
Figura 5.18 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb zinc zwitterió respecte la forma quelada de ferro zwitterió experimental.	60
Figura 5.19 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb zinc respecte ferro comercial.	61

Agraïments

En primer lloc, m'agradaria agrair al meu tutor Francesc Sepulcre, per la seva gran implicació en el treball, per guiar-me durant el mateix i el suport acadèmic necessari per tirar endavant.

A l'empresa CiTAF SL, el qual m'han ofert les seves instal·lacions i a l'empresa Umbrella F&FI, S.L. pels seus aparells i materials de laboratori. Al professor i tutor Xavier Sàez en especial, per haver-me motivat a realitzar el treball i per l'ajuda a la hora de resoldre dubtes i revisió en el treball. Sense deixar de mencionar a Elena Pera, Frederic Ferrando per l'ajut moral i intel·lectual que he necessitat.

A l'Enric Centelles, per l'ajut en les proves realitzades en el laboratori 110 d'unitat d'anàlisi de l'ESAB, on havia l'equip necessari per portar a terme una part important de la part experimental del treball.

D'altra banda, agraeixo a tots els companys i professors que durant el transcurs del projecte s'han preocupat o m'han ajudat en el transcurs del treball. En especial, Cristina Fortún per haver estat ajudant en el transcurs d'experiments i per l'ajut moral.

Finalment, a tota la família, amics, parella o gent que en un moment o altre, s'han preocupat de mi durant la carrera i en aquest moment de la meva vida. Gràcies!.

1. Introducció

Des de fa uns anys que s'utilitzen els minerals alhora de suplementar aliments per a cobrir carències o per complementar la dieta. Inicialment, els minerals necessaris es prenen en forma de sals minerals inorgàniques, on el nutrient (catió) tenia una molt baixa biodisponibilitat. Això succeeix perquè el mineral ingerit es troba en forma de sal inorgànica amb un alt percentatge de catió, però poc soluble. En molts casos la solubilitat d'aquestes sals inorgàniques són dependents del pH de l'estómac, que a més, acostumen a interaccionar en la digestió (Ashmead 1993). El que causa que s'hagi de prendre en excessiva quantitat per a que el cos en pugui absorbir un mínim. Com a conseqüència d'aquesta sobredosi a la ingesta, es poden patir nàusees, efectes laxants, irritacions gàstriques i altres inconvenients a nivell productiu i de formulació dels aliments, així com originar un gust indesitjable (Haro 2006). Degut a aquests problemes d'absorció i sobredosis, es troba necessari buscar una manera alternativa d'aportar els minerals amb més biodisponibilitat i que no afecti a altres components presents en el complement alimentari o aliment.

Una innovadora solució són els quelats aminoàcids i la microencapsulació de minerals. Sobre els quelats aminoàcid s'han publicat estudis realitzats en persones (Gandia et al. 2007; Pineda et al. 2001). S'ha pogut comprovar que els minerals en forma quelada (lligada) són realment absorbits a l'estómac i en les cèl·lules de la mucosa, tenint un comportament de transport actiu durant la digestió (apartat 2.2.2). Aquests quelats permeten als minerals de ser absorbits al llarg del procés biològic amb els aminoàcids, com a unitats simples, utilitzats com a transportador de molècules.

Des de que els quelats aminoàcids metàl·lics poden fer-se servir com a font mineral d'aliments i com complementes alimentaris, s'ha incrementat la necessitat de realitzar algun mètode per caracteritzar aquests quelats aminoàcids. En l'actualitat no existeix un mètode acceptat per a la detecció, la identificació i quantificació dels quelats d'aminoàcids de metall pel Conveni d'Estats Units Pharmacopeial (USP), Associació de Comunitats Analítiques (AOAC), o la Food and Drug Administration (FDA) segons (Thompson 2006). Empreses del sector de la nutrició mineral, com Albion (apartat 4.1.1.7), han intentat proposar maneres que permetin la identificació de compostos mitjançant la lectura del seu espectre amb la tècnica FT-IR, o el que es coneix com a TRAACS®.

A partir d'articles on tracten de l'assignació de bandes en l'espectre de la glicina cristal·lina en forma zwitterió (o glicina en forma neutre), es pot veure que hi han dificultats alhora d'analitzar l'estructura de les seves bandes. Alhora d'interpretar el mineral quelat hi haurà el mateix problema de conflicte entre bandes, fet que pot donar lloc a error al interpretar (Rosado et al. 1998).

2. Antecedents

2.1. Els rols dels minerals i el seu ús en la indústria alimentària

Els minerals es consumeixen de forma natural, depenent de l'origen provenen de forma vegetal o animal. El consum mínim del mineral en concret no sempre s'assoleix i com a conseqüència, es pot arribar a tenir deficiència del mateix. Per a garantir el consum dels minerals són utilitzats com a productes funcionals.

Els minerals es classifiquen en dos grups: macronutrients i elements traça. Als minerals se'ls atribueix les següents funcions (Ashmead 1993):

- Manteniment i creixement de la fermesa i suavitat del teixit del cos.
- Regulació dels processos biològics i fisiològics.
- Participació com a cofactors essencials en reaccions enzimàtiques que transformen químicament els aliments en altres metabòlits, que alliberen energia.

Un producte funcional és aquell que garanteix un nivell mínim de mineral (15% Valor de Referència de Nutrient). Aquests productes es classifiquen en dos grups:

Aliments funcionals són aquells tipus d'aliments d'origen vegetal, animal o mixt els quals se'ls han:

- a) Afegit certes substàncies amb propietats saludables: nutrients i/o altres ingredients similars amb propietats saludables, per conferir-los determinats efectes beneficiosos.
- b) Suprimit certs components de l'aliment: sucre, greix, proteïnes, colesterol, gluten, etc. Que poden ser perjudicials per certs "col·lectius de risc" (diabètics, obesos, hipertensos, celíacs, etc). O bé aquelles persones que segueixen dietes hipocalòriques, hipoglicèmics, hiperlipèmies entre d'altres, substituint parcial o totalment els citats components per altres, per convertir-los en aliments aptes i saludables per determinats tipus de consumidors.

Complements alimentaris són complements amb ingredients funcionals que es presenten amb la finalitat de complementar la ingesta de nutrients en la dieta normal, consistents en fonts concentrades de nutrients o altres substàncies que tinguin efecte: nutricional o fisiològic, en forma simple o combinada. Comercialitzats en forma dosificada en càpsules, tablettes, pastilles, i altres formes similars, sobres de pols, ampolles de líquids, ampolles comptagotes i altres formes similars de líquids i pols que s'han de prendre en petites quantitats unitàries (Gavilán 2009).

2.2. Suplementació mineral

Les interaccions químiques entre el nutrient en la dieta i els components de l'ambient intestinal són les que determinaran el grau d'absorció del mineral. Depenent de la forma química en que es trobi el mineral, s'absorbirà en la membrana de la mucosa de les cèl·lules intestinals.

2.2.1. Sals minerals inorgàniques

A l'ingerir un suplement alimentari que conté sals minerals inorgàniques, durant el procés digestiu al mineral li succeeix el següent:

La sal mineral entra a l'estómac provocant que durant el procés digestiu dissociï el component mineral de l'estructura. L'ió mineral alliberat pot entrar en contacte amb la paret de la mucosa de l'estómac, fet que pot originar efectes indesitjables tals com mal sabor, olor i irritacions a les parets de l'estómac.

L'ió lliure del mineral es pot veure atret per altres substàncies ingerides en anterioritat que es troben carregades, com són el cas de: vegetals, fibra, greixos, etc. Aquestes substàncies segresten el mineral i fan que no siguin ni absorbits ni aprofitats pel cos.

Degut a l'estructura i els canvis que té una sal mineral inorgànica durant el pas del tracte digestiu, comporta una baixa biodisponibilitat del mineral al cos i amb competència amb altres minerals per entrar dins les cèl·lules del cos (Ashmead 1993).

2.2.2. Minerals microencapsulats

La microencapsulació és un procés en el que l'ió metàl·lic és encapsulat en una capa contínua de material de revestiment que el separa físicament de la matriu de l'aliment. El principal avantatge d'aquesta tècnica és l'elevada biodisponibilitat del mineral. És útil per a la majoria de productes secs per infants, mixos de begudes (els diferents components homogeneïtzats que conté una beguda), entre d'altres. L'embolcall pot ser una barreja de fosfolípids, polisacàrids, proteïnes o olis parcialment hidrogenats. Aquest embolcall cobreix a l'ió metàl·lic de l'exterior, per aconseguir tenir una microcàpsula de 20 µm. Això fa que l'ió recobert tingui una alta estabilitat i concentració de mineral biodisponible. S'evita el gust a metàl·lic i l'ennegritment de les dents produït pel color característic del ferro i les substàncies que el porten (Oldewage-Theron et al, 2002; Kremer 2007).

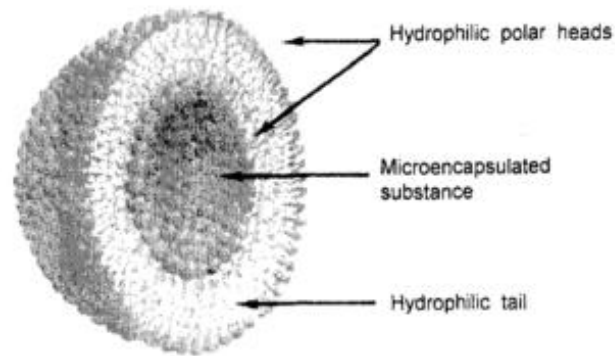


Figura 2.1 Gràfica del procés de microencapsulació d'una substància. Font: (Oldewage-Theron et al. 2002).

S'han realitzat estudis comparant el comportament del ferro microencapsulat respecte un control (sulfat de ferro). Per a comprovar la biodisponibilitat d'aquest suplement alimentari, es va realitzar un assaig amb 17 persones adultes, per avaluar el nivell de transferrina i de sèrum de ferro en sang, utilitzant el ferro microencapsulat respecte el sulfat de ferro. Es va observar que el ferro microencapsulat es troba com a mínim igual de biodisponible que el sulfat de ferro (Lázaro 2013).

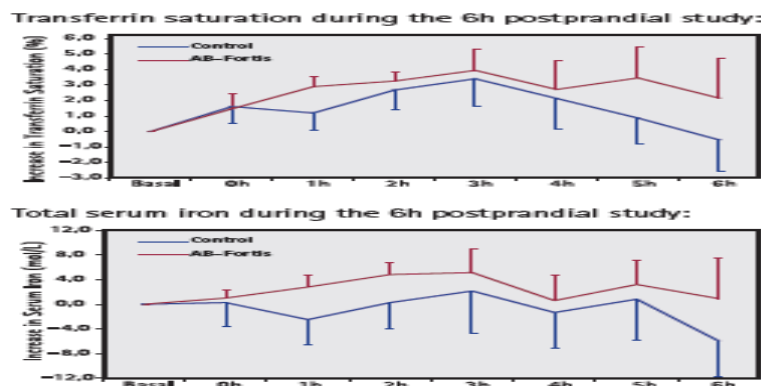


Figura 2.2 Gràfica de resultat entre sulfat de ferro i ferro microencapsulat. Font: (Lázaro 2013).

2.2.3. Minerals aminoàcids quelats

El quelat aminoàcid té una estructura que permet protegir el mineral, que és lo suficientment forta com per no deslligar-se i suportar el procés digestiu, però lo suficientment dèbil per a que el mineral s'alliberi en el lloc correcte del jejú. Cada lligant del quelat aminoàcid manté el mineral estable i assegurat durant el procés digestiu.

L'aminoàcid embolcalla el mineral, el protegeix i fa que no es dissociï durant el transcurs del procés digestiu, ja que aquest quelat aminoàcid es troba en forma neutre (càrrega neutre), així no es veu atret a lligar-se amb altres substàncies que es troben en el procés digestiu (estómac i intestí). Els minerals en forma de quelat, tenen un rati d'absorció de 20 vegades més de biodisponibilitat que la forma inorgànica.

La definició de aminoàcid quelat adaptada de NNFA board of directors, juliol de 1996 diu que "Els quelats metàl·lics aminoàcids són el producte resultant de la reacció d'un ió metàl·lic provinent d'una sal metàl·lica soluble, amb un aminoàcid d'un rati molar de metall a 1 a 3 (preferiblement 2) mols d'aminoàcids per a formar enllaços coordinats covalents. La mitjana del pes molecular de l'aminoàcid hidrolitzat ha de ser d'uns 150 AMU (unitats atòmica de massa) i el quelat resultant no ha d'excedir de 800 AMU. La quantitat mínima de l'element metàl·lic s'ha de declarar. S'ha d'anomenar com a aminoàcid quelat metàl·lic". Exemple: Copper Amino Acid Chelate.

L'estudi de la interacció entre un catió metàl·lic i la glicina és una àrea de gran interès a causa de la importància que té en els processos biològics. Encara que s'han realitzat estudis teòrics sobre l'assignació dels quelats aminoàcids metàl·lics (Hartle 2003; Yunarti et al. 2013), cap autor no ha pogut calcular experimentalment els enllaços de la glicina amb els ions metàl·lics degut a la complexitat alhora de recollir dades de tots els cations, segons (Ai et al, 2005). A més, aquest últim autor parla de la forma teòrica sobre la possible estructura del catió ferro amb la glicina. És a dir, el catió es pot trobar unit amb el carboxil i el grup amino de la glicina (combinació I) o el catió unit només amb el carboxil (combinació II) de la Figura 2.3.

Algunes fonts consultades sobre quelats minerals aminoàcids, descriuen que els cations dels minerals es troben units a l'amino i al carboxil de la glicina, com en el cas I de la figura 2.3 (Hartle et al. 2003; Yunarti et al. 2013). Aquestes conclusions venen donades per uns resultats experimentals propis de cada font mencionada amb unes metodologies no oficials, no fent possible una comparació de resultats entre si. Per tant, per manca d'informació no es pot afirmar una conclusió d'algun model (Figura 2.3).

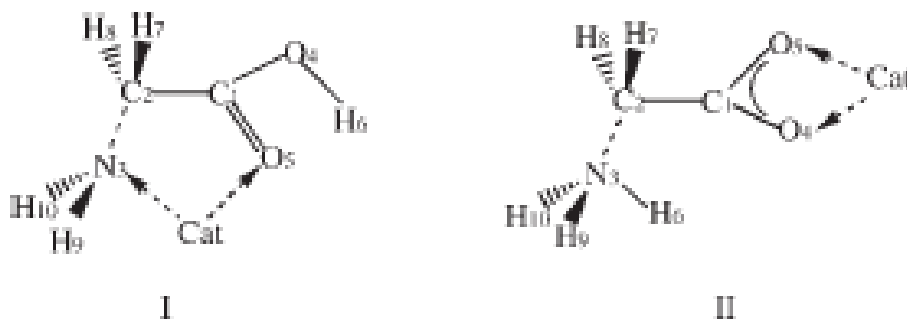
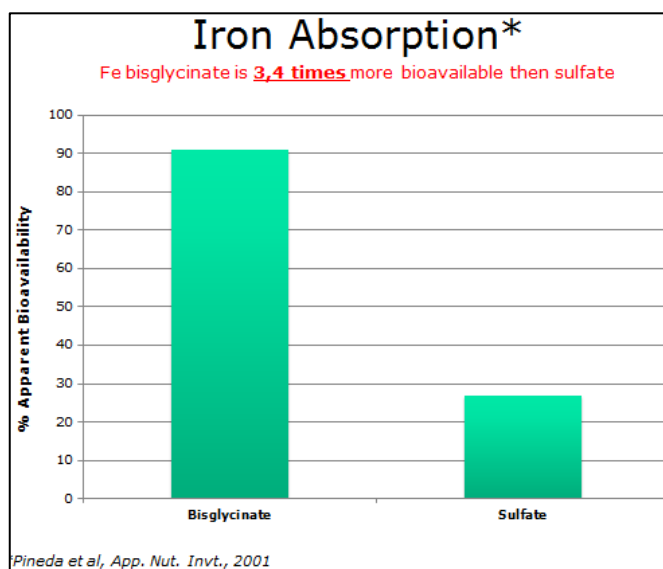


Figura 2.3 Dues possibles combinacions d'unió de la glicina amb el catió. Font: (Ai et al. 2005).

Els quelats aminoàcids poden ser els substituïts a les sals inorgàniques degut: La baixa biodisponibilitat de la sal inorgànica (Figura 2.4) o per l'increment de mineral viable respecte un complex mineral àmpliament utilitzat (Figura 2.5).

- **Anèmia infantil:** En la figura 2.4 trobem el gràfic de l'absorció de ferro al cos en nens de diverses edats de dos compostos, sulfat de ferro a la dreta i bisglicinat de ferro a l'esquerra. Durant 28 dies es va realitzar un estudi a quaranta nens de 6 a 36 mesos d'edat, amb anèmia per deficiència de ferro on van ser agrupats i assignats en dos grups. Un grup va rebre bisglicinat de ferro i l'altre grup sulfat de ferro. Ambdós grups van tenir augments d'hemoglobina significatius ($P < 0,005$) en la ferritina plasmàtica. Se'n pot extreure la conclusió que el bisglicinat de ferro és 3,4 cops més viable que el sulfat de ferro (Pineda et al. 2001).

Figura 2.4 Gràfica que mostra l'absorció de ferro de dos compostos, sulfat de ferro a la dreta i bisglicinat de ferro a l'esquerra. Font: (Pineda et al. 2001).



- **Carències de zinc:** En l'article (Gandia et al. 2007), s'estudia l'absorció de zinc en dotze dones sanes que ingereixen un complement de bisglicinat de zinc i un complex de zinc (com és el zinc gluconat), per a suplir les carències de zinc a la dieta (DRI) amb una suplementació mineral. Les proves de l'estudi consistien en un tractament d'una setmana, de dotze dones divides en dos grups, que els van subministrar dues dosis de sèrum al dia, que contenien zinc de forma gluconada o del bisglicinat de zinc quelat. Els resultats de la figura 2.5 recalquen que la ingesta de bisglicinat de zinc és segura i tolerada pel cos i en comparació, el zinc com a font de quelat es un 43,44 més viable que la sal gluconada.

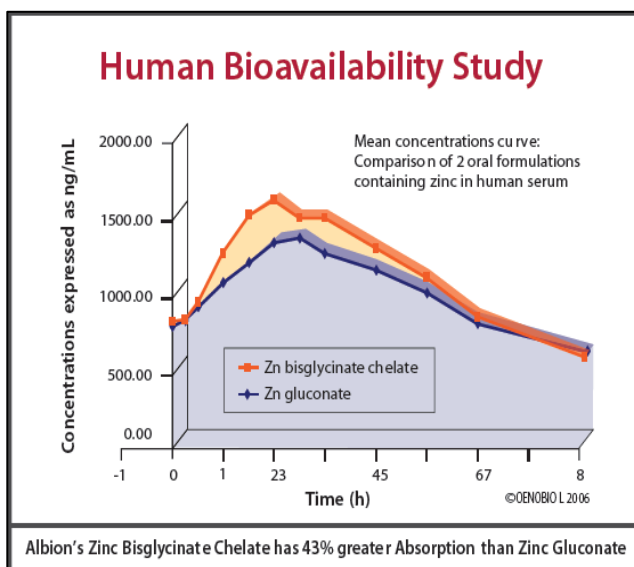


Figura 2.5 Mitjana de les concentracions de zinc en sèrum humà del compostos, gluconat de zinc i bisglicinat de zinc. Font: (Gandia et al. 2007).

2.2.3.1. Mètode d'identificació dels minerals quelats aminoàcids.

Com s'ha descrit, els quelats aminoàcids metàl·lics i encapsulats metàl·lics s'utilitzen com a font mineral en els suplementes alimentaris. Actualment, els productes en que s'utilitzen els quelats aminoàcids metàl·lics no hi ha un mètode acceptat de detecció, identificació o quantificació dels quelats d'aminoàcids de metall per diferents organitzacions com la USP, AOAC, o la FDA segons (Thompson 2006). Empreses del sector de la nutrició mineral com Albion, utilitzant la tècnica FT-IR d'estudi de la lectura dels espectres resultants (materials 4.2.1), han intentat proposar un model per a la identificació de compostos.

2.3. Característiques de la glicina

La manera en el que el catió de l'aminoàcid quelat s'uneix amb la glicina, resideix en entendre les diferents formes de la glicina: àcida, zwitterió i bàsica (Figures 2.6 i 5.1).

La glicina zwitterió té la següent estructura: $\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ amb un pH comprès de 3 a 9. En aquest pH la glicina zwitterió comparteix el grup del carboxil desprotonat (COO^-) de la glicina bàsica i la part protonada de l'amino (NH_3^+) de la glicina àcida. La forma zwitterió de la glicina té el grup carboxil desprotonat a $\text{pKa} > 2,6$ i el grup amino es dissocia a $\text{pKa} 9,8$. És a dir, és el rang de pH en el que el catió es pot unir a la glicina (apartat 5.1).

Per tant, és important l'assignació de bandes de la glicina zwitterió per a conèixer l'estat de protonació dels grups amino i carboxil. Però, en l'espectre es troben certes bandes molt àmplies, en les regions dels enllaços: $\nu\text{O-H}$, $\nu\text{N-H}$ i $\nu\text{C-H}$. Causant, que alhora d'assignar algun d'aquest enllaç en l'espectre, resulti difícil d'identificar (Rosado et al. 1998).

La identificació dels enllaços de la glicina en les diferents formes en que es troben, permeten obtenir una font d'informació important de cada enllaç, essencial per veure les diferències que poden haver respecte un espectre amb glicina o amb un espectre de glicina junt amb el catió.

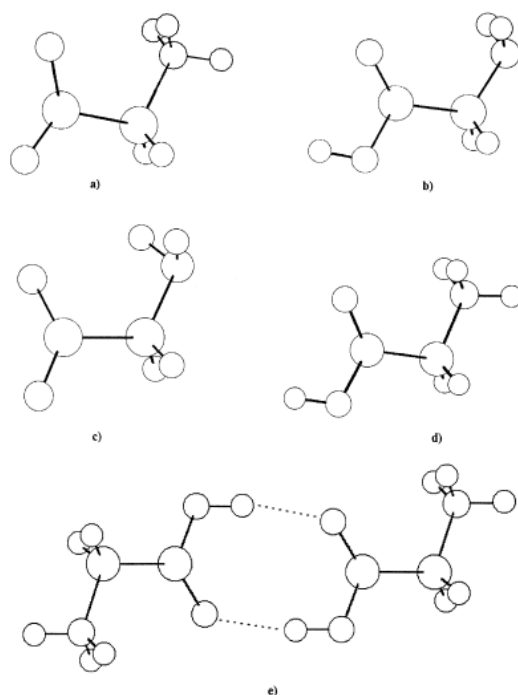


Figura 2.6 Estructures moleculars de la glicina: a) glicina zwitterió, b) glicina neutre, c) glicina bàsica, d i e) glicina àcida (monòmer) i glicina àcida (dímer) respectivament. Font: (Rosado et al. 1998).

3. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és la caracterització estructural de diferents quelats de glicina.

Els objectius específics derivats del principal són:

- 1-Realització de cristalls de glicina i quelats de glicina a pH diferents per a cobrir els estats de protonació que els grups amino i carboxílic poden tenir.
- 2-Characterització mitjançant FTIR dels quelats de glicina amb ferro.
- 3-Characterització mitjançant FTIR dels quelats de glicina amb zinc.

4. Materials i mètodes

En aquest apartat apareixen descrits els materials necessaris per a la realització i de la identificació dels quelats fets de forma experimental.

4.1. Materials

4.1.1. Productes

Per a poder realitzar els aminoàcids quelats en el laboratori, necessitem disposar dels següents productes:

4.1.1.1. Glicina

La glicina és l'aminoàcid que s'utilitzarà per a poder fer els diferents quelats. Soluble en aigua, medi en el que s'obtingran els cristalls. La L-glicina va ser obtinguda de l'empresa Monteloeder S.L. (Elx/Alacant), afegint-se en una proporció del 25% a la barreja (mètodes 4.2). Té les següents característiques en la fitxa tècnica (monteloeder 2015). La glicina d'origen (sintètic o natural) es troba permesa en la UE (Unió Europea) com a ús en aliments per a particulars usos nutricionals com a font d'aminoàcids, sota la Directiva 2001/15/EC (EC,2001). La glicina i les seves sals (E640) són permeses per ser incloses en aliments en Europa sota la directiva 95/2/EC (EC, 1995) segons (the EFSA Journal 2006).

4.1.1.2. Sulfat de ferro (II) heptahidrat

Aquest producte prové de l'empresa PANREAC situada a Barcelona (Castellar del Vallès), amb una alta puresa i el qual es troba regulat d'acord amb ACS, ISO, Ph. Eur. i USP.

El sulfat de ferro (II) heptahidrat és el producte utilitzat per fer la interacció de l'ió ferro (de color blau-verdós) amb la glicina, per a poder obtenir l'aminoàcid quelat descrit en el procés (Rosado et al, 1998; Yunarti et al. 2013). Es tracta d'un producte soluble en aigua (29,5gr/L en aigua). La decisió d'utilitzar aquest tipus de sulfat de ferro, va ser la motivada de fer servir els mateixos compostos que els que van emprar en l'article (Yunarti et al. 2013), on la base de l'experiment va ser extreta d'allà. En la reacció es va afegir el 10 % de sulfat de ferro (II) del total (Figura 4.1).



Figura 4.1 Aspecte del producte sulfat de ferro (II) heptahidrat. Font: pròpia.

4.1.1.3. Zinc sulfat monohidrat

El zinc sulfat monohidrat prové de l'empresa PANREAC com en el cas del sulfat de ferro.

S'utilitzarà la sal de zinc com a producte per fer interaccionar l'ió zinc (color blanquinós) amb la glicina, per a obtenir el quelat de glicina seguint el procés realitzat en les següents fonts com en el cas del ferro: (Rosado et al, 1998; Yunarti et al. 2013). El sulfat de zinc (II) té una solubilitat en aigua de (800 gr/L). En la reacció es va afegir un total del 6 % de sulfat de zinc (Figura 4.2).



Figura 4.2 Aspecte del producte zinc sulfat monohidrat. Font: pròpia.

4.1.1.4. Hidròxid de sodi (NaOH)

L'hidròxid de sodi utilitzat prové de l'empresa POCH de venda per catàleg. Aquest producte és una base forta i el seu ús és el d'incrementar el pH de la dissolució (basificar-lo). Abans d'utilitzar-se en la dissolució es van aixafar les píndoles del NaOH i en dissolució amb aigua per a fer més fàcil la introducció en la reacció. En la reacció es va afegir un total del 3 % de NaOH per assolir un medi neutre a pH entre 4 i 9.

4.1.1.5. Àcid cítric

Producte provinent de l'empresa Quimidroga, S.A. distribuïdora i comercialitzadora de productes químics a Espanya, estant així en llocs com a Barcelona. L'àcid cítric o E-330 es tracta d'un àcid orgànic, dèbil present en diverses fruites i verdures, regulador del pH i apte pel consum humà. Es presenta en forma de pols blanca cristal·lina, soluble en aigua, en etanol (96%), sense olor ni color. Compleix normatives de farmacopea europea, de la USP, FCC i reglament UE 231/2012 de la comissió.

4.1.1.6. Àcid Clorhídric

L'àcid clorhídric (HCl), és un àcid fort, utilitzat per acidificar el medi. El producte es trobava en una solució aquosa en proporció (1/5). Es va afegir (previ mesura del pes en una balança analítica) cuitosament amb un comptagotes degut a la seva perillositat. En la reacció es va afegir en un total del 13% d'HCl per assolir un medi àcid pH inferior a 3.

4.1.1.7. Aminoàcids quelats comercials

L'empresa Albion comercialitza minerals aminoàcids quelats amb un alt percentatge de mineral quelat en el producte final. El sistema TRAACS (the real amino acid chelate system) valida els productes quelats i descriu els lligands en la molècula, reconeixent l'espectre de cada mineral que produeix com a estàndard per cada quelat.

En el treball s'ha pogut realitzar un anàlisi de les mostres de Ferrochel* (ferro bisglicinat) i el zinc bisglicinat (Figura 4.3) en l'aparell FT-IR, amb els espectres resultants poden fer-se servir com a referència alhora de comparar els espectres fets experimentalment.

Tot i que la major part del producte es tracta del mineral quelat, observant la fitxa tècnica de les mostres analitzades comercials, s'aprecien altres ingredients no propis del quelat (però útils per a la fabricació del producte), que podrien aparèixer en l'espectre, és a dir, informació no rellevant del que de veritat interessa, que és sobre el quelat.

Encara que l'ús per l'estudi del comportament dels lligands d'uns quelats aprovats i provats industrialment són útils i es varen fer servir per a la comprovació final, es va pensar que seria una bona idea el complementar l'anàlisi del producte comercial amb el mineral quelat en forma pura experimental.

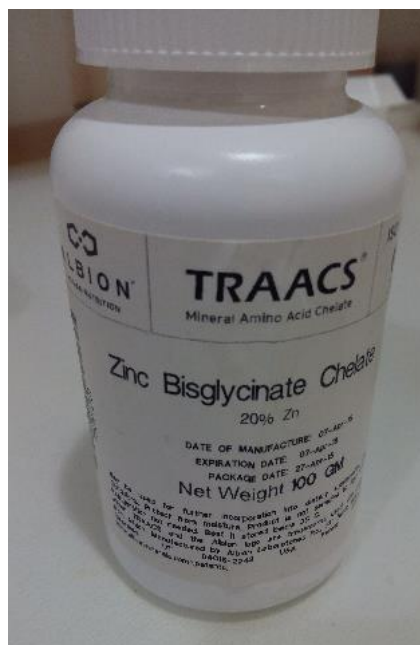


Figura 4.3 Bisglicinat de ferro (esquerra) i bisglicinat de zinc (dreta) de la casa Albion. Font: pròpia.

4.1.2. Analítics

Descripció del procés d'execució de proves de la part experimental, d'elaboració dels minerals quelats i de l'anàlisi dels propis.

4.1.2.1. FT-IR

La espectroscòpia infraroja es tracta d'una tècnica basada en l'estudi de les vibracions dels àtoms d'una molècula. Un espectre infraroig s'obté mitjançant radiació sobre una mostra i determinant quina fracció és absorbida en una energia particular. L'energia a la qual qualsevol pic en un espectre d'absorció apareix, correspon a la freqüència de la vibració d'una part d'una molècula de la mostra (Stuart 2004).

Existeixen diverses regions de l'espectre electromagnètic classificats com: ones de radio, microones, infraroig, ultraviolat, raigs X i raigs γ (Figura 4.4).

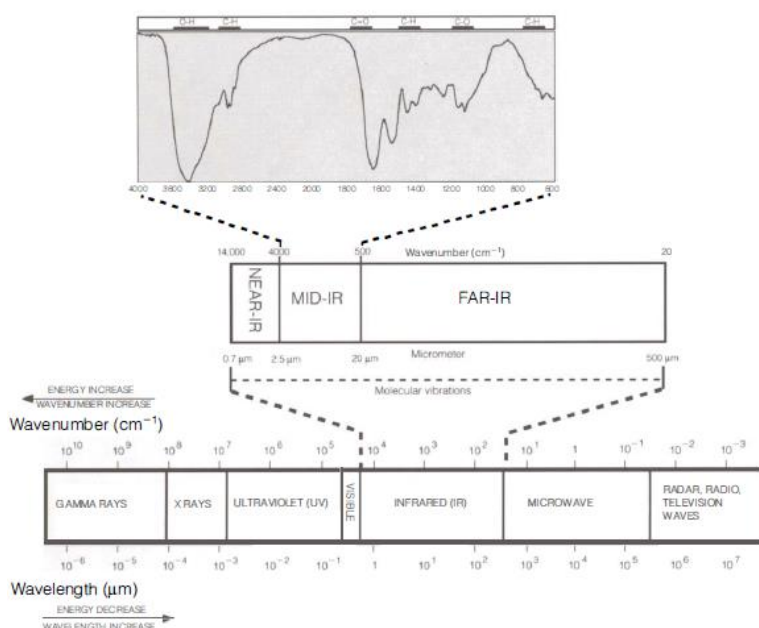


Figura 4.4 Regió espectral de la radiació electromagnètica, amb una ampliació en la regió IR.

Font: (Derrick 1999).

Les molècules absorbeixen la radiació electromagnètica en paquets discrets d'energia o quants. L'absorció es produeix només quan la radiació que incideix sobre la substància proporciona el quant d'energia adequat.

La radiació electromagnètica es defineix com dos camps elèctrics i magnètics, perpendiculars entre si, oscil·lant en plans individuals entre si. Aquests camps estan en fase i es propaguen com una ona sinusoïdal (Figura 4.5). Les magnituds dels vectors magnètics i elèctrics es representen per E i B, respectivament.

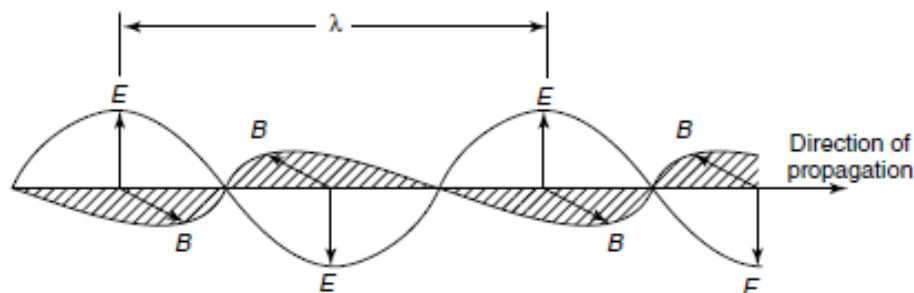


Figura 4.5 Representació d'una ona electromagnètica. Font: (Stuart 2004)

Una altra manera de descriure la freqüència de la radiació electromagnètica, és amb el **nombre d'ona**, ν , definit com el nombre d'ones en la longitud d'un centímetre, expressat en cm^{-1} (equació 4-1).

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (4-1)$$

L'energia d'un fotó es directament proporcional a la seva freqüència i inversament proporcional a la seva longitud d'ona. La seva energia ve donada per l'equació de Bohr (equació 4-2).

$$E = h\nu \quad (4-2)$$

On h és la constant de Planck ($h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$) i ν fa és la freqüència.

Els processos de canvi, inclòs la vibració i rotació relacionada amb l'espectroscòpia infraroja, pot ser representada en termes d'energia quantitzada discreta en nivells E_0 , E_1 , E_2 , etc (Figura 4.6), on cada àtom o molècula en un sistema ocupa nivells d'energia. En un gran acoblament de molècules hi haurà una distribució de tots els àtoms o molècules entre aquests diferents nivells d'energia. La quantitat d'energia emesa o absorbida, ha de ser igual a la diferència entre els dos nivells (Figura 4.6). Un fotó d'energia pot emetre o absorbir un electró, amb el pas d'energia d'un nivell més alt (E_n) a un estat de menor (E_1) o d'un nivell menor a un nivell d'energia més alt, el que es coneix com energia de transició, ΔE .

Encara que un element està exposat a la radiació de totes les longituds d'ona, només les longituds d'ona d'energia (fotons), que coincideixen amb els nivells d'energia (estats) dins d'aquest àtom poden interactuar. El patró resultant de les línies d'energia, anomenat un espectre, coincideix amb l'absorció o emissió dels fotons específics a aquest element particular.

La freqüència d'emissió o absorció de la radiació de transició entre els estats d'energia E_0 i E_1 venen donats de (equació 4-3):

$$\nu = (E_1 - E_0)/h \quad (4-3)$$

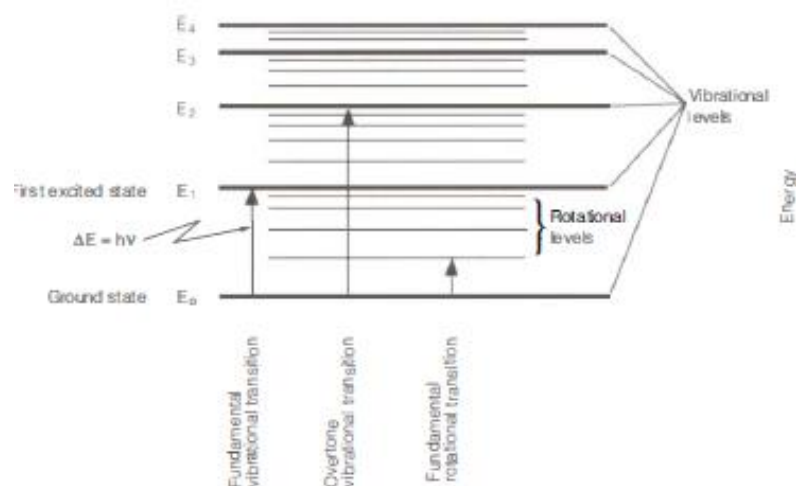


Figura 4.6 Nivells vibracionals d'energia d'una molècula. (Derrick 1999).

4.1.2.1.1 Modes de vibració

En les molècules senzilles (diatòmiques i triatòmiques), és possible la deducció del número i classe de vibració, i si aquestes vibracions provocaran una absorció. Les molècules complexes, poden contenir diferents tipus d'àtoms i enllaços i en aquests casos la gran quantitat de vibracions possibles, fan que els espectres d'infraroig resultin complicats d'analitzar.

El número de vibracions possibles en una molècula poliatòmica, es calcula de la següent manera: Si es necessiten 3 coordenades per localitzar un punt en l'espai, per fixar N punts es requereixen 3 coordenades per cada un, un total de 3 N. Cada coordenada correspon a un grau de llibertat per un dels àtoms en una molècula poliatòmica i per aquest motiu, si una molècula conté N àtoms, es diu que té 3N graus de llibertat. En una molècula linear, hi ha 3N-5 graus de llibertat (degut a que els àtoms es troben en una línia recta i no es fa possible la rotació al voltant de l'eix de l'enllaç), pel que fa a les molècules no linears hi ha 3N-6 graus de llibertat.

4.1.2.1.2 Tipus de vibracions

Els àtoms no es troben estàtics dins d'una molècula, sinó que es troben en moviment constant vibrant en torn als enllaços, a freqüències constants. A mesura que els àtoms s'apropen entre ells, les forces de repulsió augmenten i conforme es separen, les interaccions d'atracció disminueixen. Es comporta com a un model similar a dues masses unides mitjançant un ressort.

Existeixen dues propietats utilitzades per explicar la freqüència de vibració. Aquestes són la rigidesa de la unió i de les masses dels àtoms a cada extrem de l'enllaç. La rigidesa de la unió pot ser caracteritzada per una constant de proporcionalitat anomenada la força constant, k (derivada de la llei de Hooke) on es pot expressar així: (equació 4-4).

$$v = k \sqrt{f * \frac{(m1+m2)}{m1*m2}} \quad (4-4)$$

v= freqüència de vibració expressada com nº d'ona (cm⁻¹).

k=constant.

f=constant de forces de la molla.

m1,m2= massa dels àtoms.

En les molècules poliatòmiques, ocorren varies interaccions entre els centres que s'han de prendre en consideració. No solament les molècules que s'absorbeixen en l'infraroig generen tensions d'enllaç, sinó que també hi ha vibracions de flexió. →

- Tensió Simètrica/ Antisimètrica en el pla (V_s i V_{as}): on el tipus de vibració suposa un canvi continu en la distància interatòmica al llarg de l'eix de l'enllaç entre dos àtoms.
- Flexió: Canvi en l'angle entre dos enllaços i són de quatre tipus: scissoring o tallament, rocking o balanceig, twisting o torsió i wagging o aleteig (Figura 4.7).



Figura 4.7 Diferents tipus de vibració de les molècules. Font:

<<<http://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/IR.htm>.>>

4.1.2.1.3 Interpretació d'un espectre

En la Figura 4.8 trobem un exemple d'un espectre. Els valors que es troben representats en un espectre corresponen a una escala logarítmica de transmissió o absorbància (en l'eix d'ordenades) en front a la longitud o número d'ona (en l'eix d'abscisses).

L'absorbància indica la quantitat de llum que absorbeix la mostra per si mateixa, i es defineix com el logaritme de $1/T$ ($1/\text{Transmissió}$), en conseqüència: $A = \log 1/T$ (Díaz et al. 2010).

El número d'ona, que correspon a una escala de freqüència expressada en cm^{-1} .

L'eix d'abscissa canvia d'escala a 2000 cm^{-1} degut a que en els espectres d'infraroig la majoria de dades útils des de el punt de vista qualitatiu apareixen en número d'ona als 2000 cm^{-1} . Així en valors majors a 2000 cm^{-1} passa a ser la meitat de la distància lineal amb relació a la resta de l'escala (Figura 4.8).

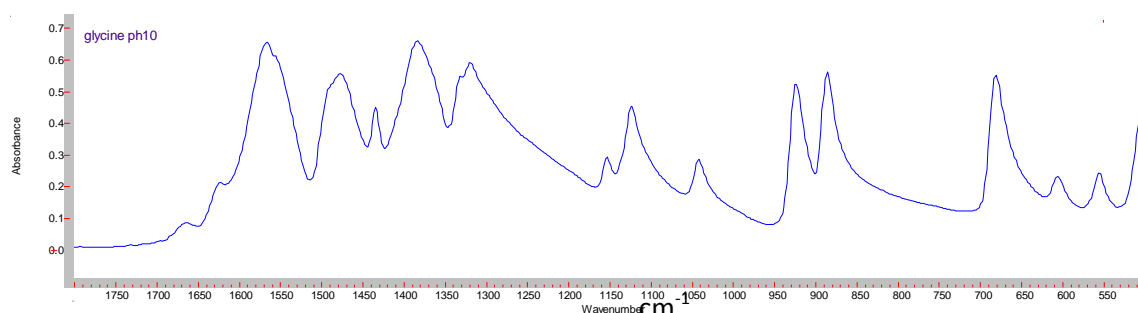


Figura 4.8 Exemple d'un espectre de FTIR de la glicina a pH 9,62. Font: pròpia.

4.1.2.1.4 Accessori de mostreig d'ATR de vidre de diamant

La tècnica de reflexió interna es basa en la formació d'una ona evanescent en el límit entre dues superfícies amb diferent índex de refracció (n). Quan el feix de radiació incideix en el material amb un angle major que el d'un valor crític, la radiació electromagnètica no pot traspasar el medi d'un menor índex de refracció tal com mostra la figura 4.9. El feix es reflecta en la cara interna del cristall (de diamant, ZnSe, Ge). Però, la ona evanescent originada penetra en l'altre medi, interaccionant amb la mostra i donant lloc a l'absorció d'aquesta de la radiació. El feix pot penetrar de forma repetida en la mostra, reflectir-se varies vegades en la cara interna del vidre, incrementant la sensibilitat de la mesura (Nicolet et al. 2001).

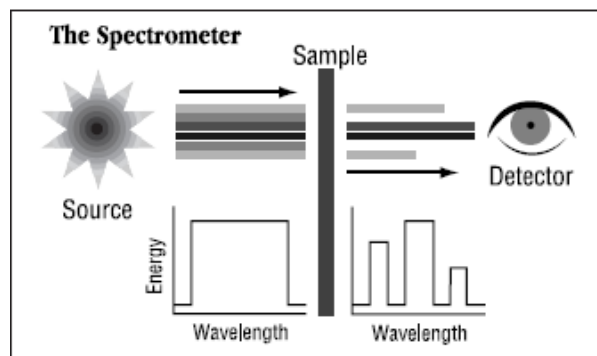


Figura 4.9 Esquema de la tècnica de reflexió interna. Font: (Nicolet et al. 2001).

Aquest espectre es coneix com Reflectància Total Atenuada (ATR). L'índex de refracció del material del vidre determina la penetració de la ona evanescent en la mostra: quan n és més gran, hi ha menor penetració i l'absorció és menor, donant espectres menys intensos. La profunditat d'ona evanescent és proporcional a la λ del feix incident, considerant-se un mateix pas òptic aparent.

El mostreig d'ATR de cristall de diamant aprofita les propietats físiques de la llum quan es troba amb dos materials amb diferent índex de refracció. Quan s'entra en contacte amb una mostra que té un índex de refracció diferent, la llum infraroja crea una ona evanescent, la qual proporciona una profunditat de penetració molt petita i específica en la mostra, abans de tornar a reflectir-se en el detector de l'espectròmetre. La tècnica d'ATR es útil per analitzar mostres de líquids, pastes, pols i alguns sòlids.

L'accessori d'ATR de vidre de diamant utilitza un vidre de diamant de tipus II a com la interfase entre la mostra i l'energia infraroja. Els avantatges d'un cristall de diamant és que té duresa extrema amb una alta resistivitat química, a més de que pot acceptar mostres amb rang de pH des de 1 fins 14. Per tant, es poden analitzar de forma segura mostres dures o abrasives, tals com els àcids forts.

L'ATR de vidre de diamant és una ATR de reflexió única, ja que si s'utilitza un dispositiu de subjecció de la mostra, s'aplica una pressió forta a les mostres de pols i sòlids per garantir el contacte òptim amb el vidre de diamant. Aquest diamant de reflexió única té una superfície de mostreig d'1 mm de diàmetre amb una àrea activa de 200 micres i amb una profunditat de penetració de 2 μm , per a la energia infraroja a 1700 cm^{-1} . L'ATR de reflexió única sobresurt una mica per sobre de la placa de muntatge de metall.

Per a netejar el vidre de diamant i posar la mostra, la premsa de la mostra ha d'estar en la posició més alta, per a que la punta d'aquesta estigui bé per a dalt del visor del mostreig de vidre de diamant (Figura 4.19). En aquesta posició es fàcil poder carregar la mostra en el seu lloc i en netejar la superfície de mostreig abans de l'anàlisi de la següent mostra.

Un cop la mostra es troba en la superfície del vidre, es baixa la premsa de la mostra de forma que la punta es trobi en contacte amb una mostra de sòlids. Ja que així, es posa en contacte la mostra i la energia infraroja que s'emet des del visor del vidre de diamant, com en la figura 4.10. (García 2011; Nicolet et al. 2001).

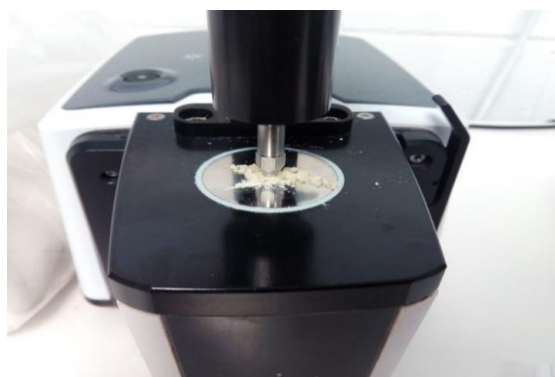


Figura 4.10 Exemple d'un mostreig amb l'aparell FT-IR. Font: pròpia.

Quan s'activa el mode anàlisi de la mostra, la longitud de trajectòria de la mostra d'ATR es fixa segons el numero de reflexions en la ATR.

En aquest treball, la espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier s'ha utilitzat per a estudiar l'estat de protonació dels grups amino i carboxil, presents en la glicina a i la glicina en forma quelada (amb ferro i zinc), en diferents valors de pH. Per a realitzar-ho, s'ha utilitzat un espectrofotòmetre FTIR de la companyia Agilent, model Cary 630 i un accessori d'ATR de vidre de diamant. Les condicions espectrals es varen fixar en 64 passades en el rang de 400 a 4000 cm^{-1} i de 400 a 1800 cm^{-1} i amb una resolució de 4 cm^{-1} .

4.1.3. Preparació de mostres

En aquest apartat apareixen explicats els materials necessaris durant el procés de preparació i execució de les diferents proves durant l'experiment.

Per a poder fer aquesta preparació, es van utilitzar vasos de precipitats de 500 mL, per a arribar a tenir un volum en la que els productes utilitzats es dissolguin bé en el medi aquós. Per a poder fer això, es va comptar amb l'ajuda d'un agitador magnètic amb regulador de temperatura (mesurat per un termòmetre) i un imant que va realitzar l'agitació. Un cop els reactius van estar homogeneïtzats en el vas, es van transvasar en un flascó i se'ls hi va mesurar el pH mitjançant el pH-metre (Figura 4.11).

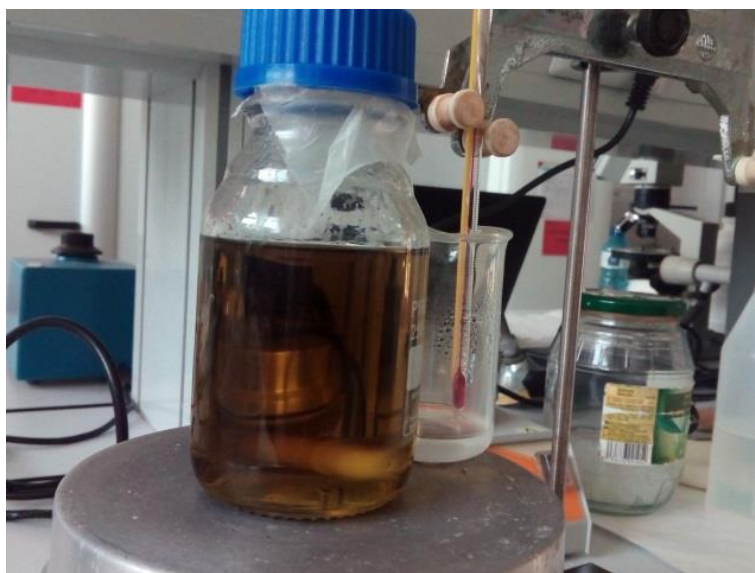


Figura 4.11 Agitador magnètic amb regulador de temperatura. Font: pròpia.

Alhora d'introduir el nitrogen en el flascó, es va fer servir un micropipetejador que regulava el cabal de nitrogen (Figura 4.12). Passats uns minuts es va retirar el flux de nitrogen i tancar el flascó. Es va tornar a endur a un agitador unes 24 hores a 50 °C. Un cop transcorregut el dia es van portar els flascons a refredar (4°C), per a mantenir la barreja en repòs (Yunarti et al. 2013).



Figura 4.12 Sortida de N_2 amb aixeta per regular el cabal. Font: pròpia.

Per a netejar els cristalls es van utilitzar els següents materials. (Figura 4.13):

- 1) Alcohol 96% per a purificar i netejar els cristalls.
- 2) Filtratge al buit amb oxigen, amb embut Büchner tal com es veu amb la Figura 4.13. És una tècnica que permet separar un producte sòlid a partir d'una barreja sòlid-líquid, la barreja sòlid-líquid s'avoca a través d'un paper de filtre en l'embut Büchner. El sòlid és atrapat en el paper de filtre i el líquid és aspirat a través de l'embut, que cau en el matràs de la trampa de buit.
 - 2.1 Tub per on està connectat el buit i arriba a dins del matràs per fer l'aspiració.
 - 2.2 Embut Buchner, on s'introdueix el sòlid per extreure el que es vol.
 - 2.3 Matràs, lloc on es dipositaran els elements extrets del sòlid.



Figura 4.13 Filtratge al buit amb embut Büchner i estris per el procés de neteja dels cristalls. Font: pròpia.

Per a poder fer el procés d'assecat dels cristalls ja nets d'impureses, s'ha utilitzat un forn (Figura 4.14), on s'ha extret la humitat dels cristalls a 40°C.



Figura 4.14 Forn a 40°C per extreure la humitat als cristalls. Font: pròpia.

4.2. Mètodes

4.2.1. Disseny

4.2.1.1. Procediment per obtenir cristalls

L'experiment per a fer els cristalls d'aminoàcids quelats de glicina amb Zn^{2+} i Fe^{2+} i els cristalls de glicina, consta d'un total de 9 proves realitzades en tres franges de pH (àcid: inferior a 3, zwitterió : entre 4 i 9 i bàsic: superior a 9). De cada franja de pH es va realitzar un duplicat (repetició) per a comprovar el resultat de l'espectre i físic, aconseguit en l'anterior experiment (Figura 4.15).

Per a fer el procés experimental de quelats aminoàcids, sobre una placa calefactora a 50 °C en agitació, es fica un flascó de vidre de 500mL en agitació. Afegint els productes descrits en l'apartat (productes 4.1.1) i homogeneïtzant en l'agitador.

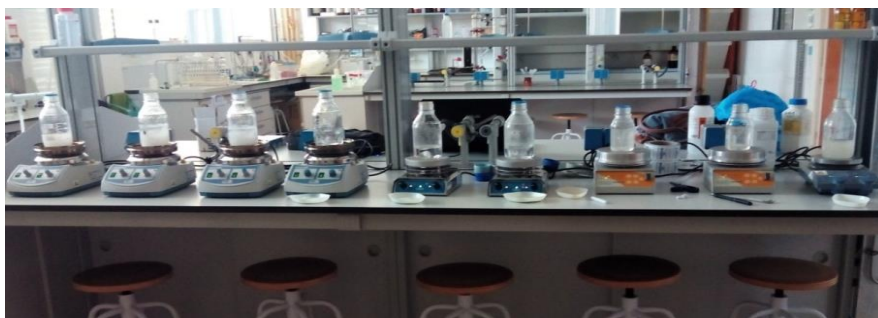


Figura 4.15 Flascons amb els ingredients necessàries per a poder fer la reacció sota un agitador.

Font: pròpia.

Per a poder treure la major part d'oxigen possible, es va introduir nitrogen amb l'ajut d'un dispensador de nitrogen (Figura 4.12). Després d'un temps d'introducció de nitrogen amb un cabal baix, es considera que en l'ambient ja no hi ha oxigen.

Es porta el flascó la placa calefactora a 50°C i en agitació constant la reacció ha de seguir unes 24 hores (Figura 4.11). Deixades passades les 24 hores, es retirà el flascó de la placa i es va posar a refrigerar a 4°C, amb la intenció de veure un sòlid en el fons del recipient.

4.2.1.2. Recuperació del cristall

Es va recuperar el sòlid que ha havia sorgit en el flascó. Per a poder netejar el cristall es va fer una filtració (Figures 4.13 i 4.16):



Figura 4.16 Embut Büchner, part del procés per fer la neteja dels cristalls. Font: pròpia.

El pas final de neteja es basa en extreure la humitat del cristall net, és ficà en un forn el cristall filtrat a uns 40°C unes 2 hores. Un cop extreta la humitat, s'agafa una mostra i es guarda el resultat fins al posterior anàlisi en el laboratori amb el FT-IR (Figura 4.17).



Figura 4.17 Cristall resultant de l'experiment (glicina amb ferro). Cada costat del quadrat fa 0,5cm.
Font: pròpia.

En la figura 4.18 es troba esquematitzat tot aquest procés de realització de cristalls de glicina i quelats de glicina amb ferro i zinc.

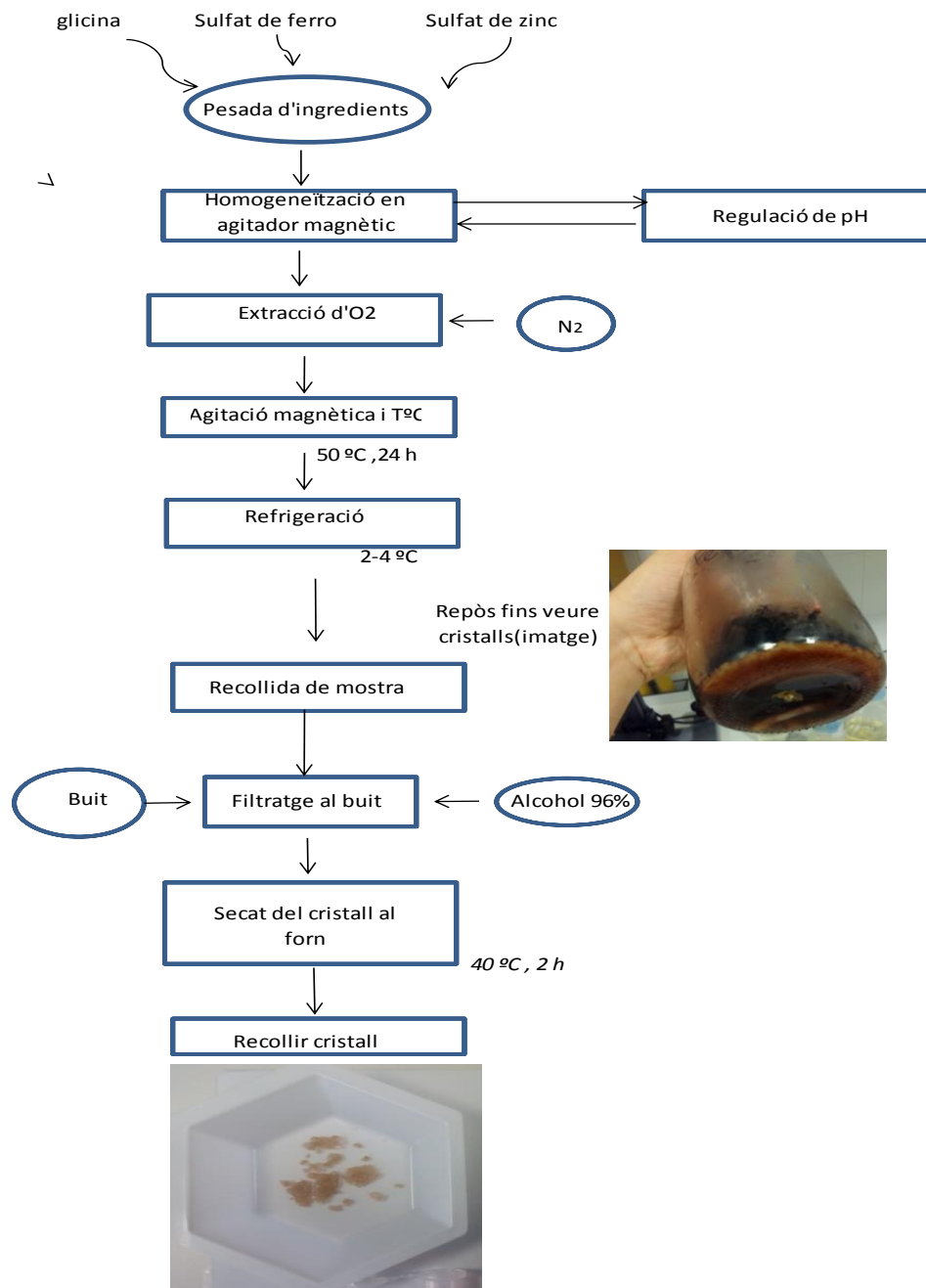


Figura 4.18 Esquema del procés d'obtenció de cristall de glicina i/o quelat de glicina amb ferro i zinc.

4.2.1.3. Mètodes per analitzar l'espectre

4.2.1.3.1 Neteja de l'accessori d'ATR per a preparar l'anàlisi

Seguir els passos de l'apartat "4.2.1.3.2 d'accessori de mostreig d'ATR de vidre de diamant", per a realitzar la neteja de l'accessori ATR (Figura 4.19).

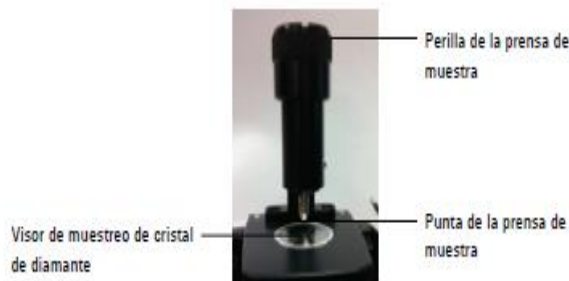


Figura 4.19 Premsa de la mostra d'accessori d'ATR de vidre de diamant en la posició més alta.

4.2.1.3.2 Recopilació d'un espectre de mostra

0. El primer pas per realitzar un anàlisi d'una mostra és la de fer un espectre de fons (background), és a dir, fer un anàlisi de les plaques de KBr sense mostra.
1. Realitzar l'espectre de la mostra (sample): Amb la mostra ja dipositada en el portamostres, fer l'escombrada per obtenir l'espectre. Aquesta escombrada es fa solapant un número predeterminat d'espectres (nº d'escombrats), els quals han de ser iguals o inferiors al número d'escombrats del background, prèvia elecció del rang de número d'ona a escombrar.
2. Un cop s'efectua la mesura, l'FTIR digitalitza la senyal i l'envia a l'ordinador on es processa l'espectre de FTIR amb l'ajut d'un software. L'espectre infraroig llavors es presenta per a la següent interpretació i una després manipulació.
3. Després del mostreig de la mostra, s'ha de netejar la mostra de l'accessori de l'aparell i assegurar-se que el vidre de diamant i la punta de la premsa estigui lliure de residus de la mostra anterior.

Es pot entendre el procés d'anàlisi d'una mostra amb l'ajut de l'aparell FT-IR amb la següent figura 4.20, en ella seguint els passos marcats pots arribar a fer un anàlisi correcte.

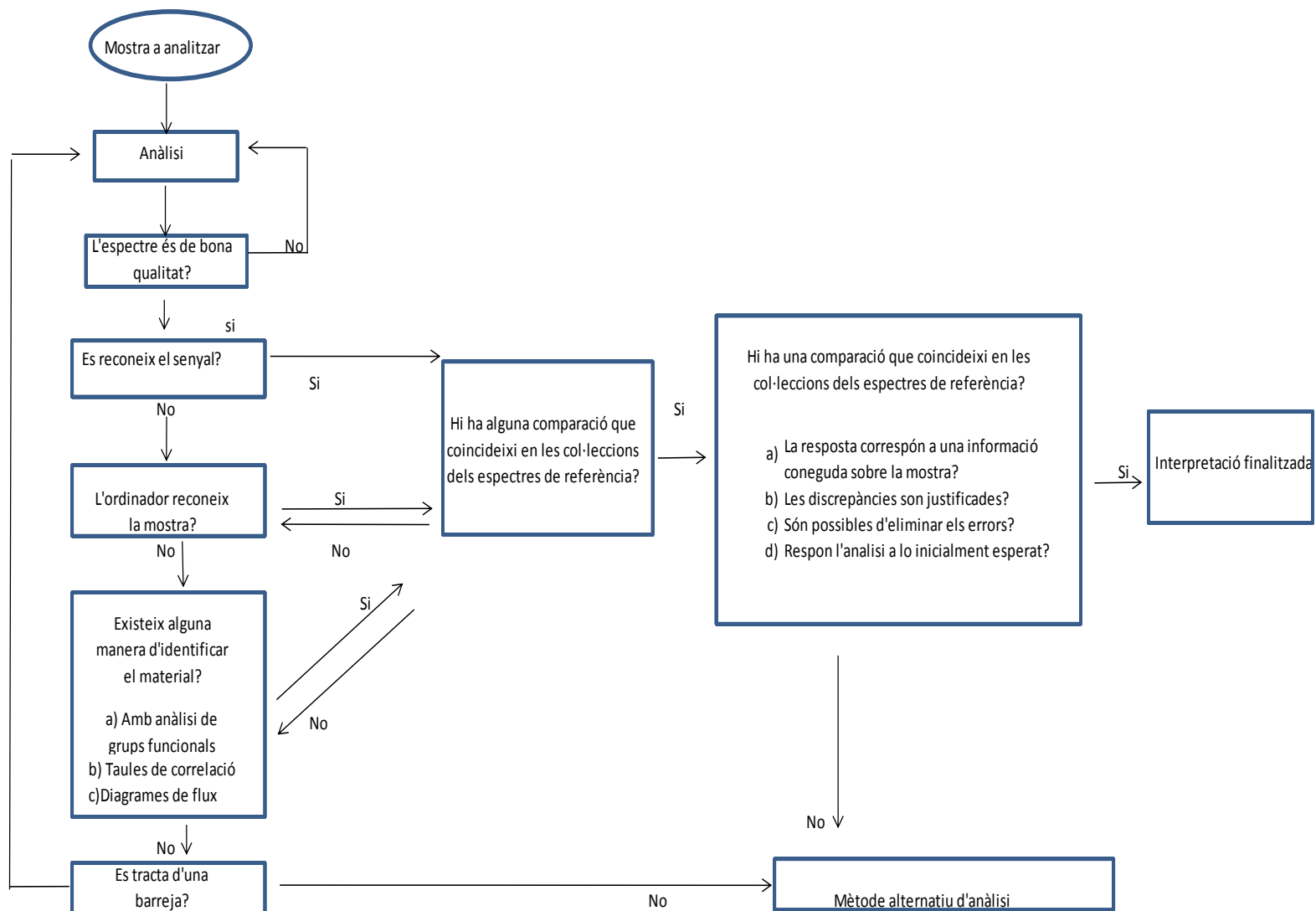


Figura 4.20 Esquema resum del mètode d'anàlisi amb FT-IR. Font : pròpia i (Derrick 1999).

5. Resultats i discussió

En aquest apartat, es presenten els resultats obtinguts dels espectres de la glicina i dels quelats de glicina amb ferro i zinc, amb l'ajut de l'espectroscòpia transformadora de Fourier (FTIR).

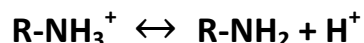
La força àcida dels grups carboxils, amino i grups-R ionitzables en aminoàcids es defineix com la constant de dissociació (K_a) o el logaritme negatiu de K_a , pK_a . El pH determina la càrrega neta (la suma de tots els grups amb càrrega presents) d'un compost. Una variació del pH de la solució, origina un canvi en la càrrega neta de l'aminoàcid (com passa amb la glicina).

La glicina zwitterió (pH 3-9) té la següent estructura: $\text{NH}_3^+\text{-CH}_2\text{-COO}^-$. Comparteix els grups del carboxil desprotonat (COO^-) de la glicina bàsica $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$ i la part protonada de l'amino (NH_3^+) de la glicina àcida $\text{NH}_3^+\text{-CH}_2\text{-COOH}$ (Figura 5.1). Alhora d'interpretar l'espectre de la glicina en forma zwitterió es troben certes bandes molt àmplies, en les regions on es troben els enllaços: $\nu\text{O-H}$, $\nu\text{N-H}$ i $\nu\text{C-H}$. Causant que resulti difícil d'identificar.

El primer grup que es dissocia, és el carboxil a $pK_1=2.6$, al ser un àcid més fort que el grup amino. En els valors de pK_a de l'interval 3-8, el grup carboxílic no es troba protonat però el grup amino sí ho està, el que es coneix com a zwitterió. El segon grup en dissociar-se és l'amino a pK_2 9.8 en medi bàsic (Nelson 2008).

A l'equació 5-1, es pot observar com els grups $\alpha\text{-COOH}$ i $\alpha\text{-NH}_2$ fan les reaccions d'equilibri iònic, els grups carboxílics i amino de la glicina al dissociar-se alliberen un protó i es queden sense càrrega (desprotonats). Quan s'addiciona un ió com pot ser el ferro o zinc en el medi amb la glicina, es pot trobar que aquest ió desplaça al protó i el substitueixi per un enllaç covalent, quan l'amino i el carboxil es troben desprotonats (equació 5-2).

Mitjançant la interpretació mitjançant FTIR, es vol comprovar si en afegir un ió o no s'origina un canvi en l'espectre de la glicina àcida, zwitterió o bàsica i de quin grup es tracta.



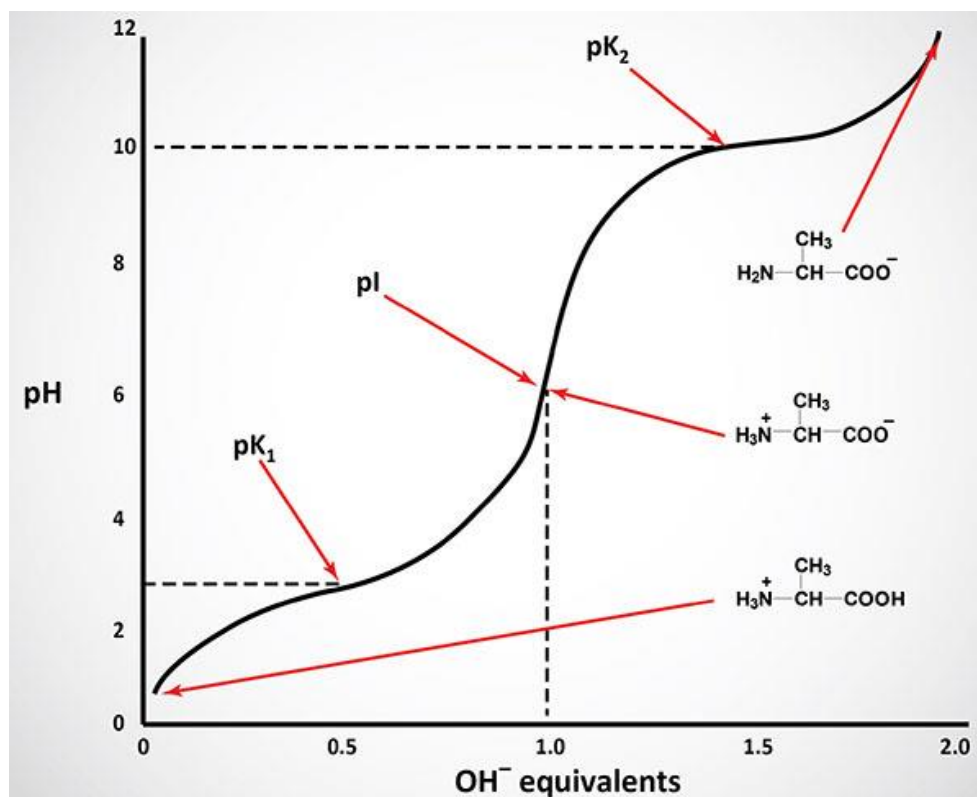


Figura 5.1 Formes iòniques de la glicina segons el pH. Font:
 <<<http://themedicalbiochemistrypage.org/es/amino-acids-sp.php>>>

5.1. Obtenció de cristalls

D'acord amb l'explicat en l'apartat 4.1.1.8, s'ha dissenyat un procediment amb l'objectiu d'obtenir els cristalls de la glicina i quelats, a diferents pH i estats de protonació àcid, zwitterió i bàsic.

S'ha obtingut les formes àcides i zwitterió de les mostres realitzades. Encara que s'han realitzat repeticions de cada franja de pH, no s'ha pogut dissenyar els cristalls de ferro, zinc i coure bàsics. Segons la font (Oldewage-Theron et al, 2002), es necessita temperatura ambient i pH de 3-10 per mantenir units els ions a la glicina. Per això, al realitzar els experiments amb temperatura i un rang superior de pH, pot ser la explicació de la manca de resultats en la franja de pH realitzat.

* En les presents fotografies de l'apartat 5.1, remarcar que cada quadre, equival a 0,5 cm.

5.1.1. Cristalls de glicina

Pel que fa a la reacció de formació de cristall de glicina, es van obtenir tres cristalls als següents pH: 3.03, 6.42, forma àcida i zwitterió de la glicina respectivament.

L'aspecte del cristall de glicina àcida, tal com es mostra en la (Figura 5.2), està compresa per diversos cristalls de forma irregular, color translúcid i no granular, amb l'aspecte d'un vidre.

Pel que fa a la glicina a pH zwitterió, l'aspecte del cristall es més granular i en forma de pols (Figura 5.2).

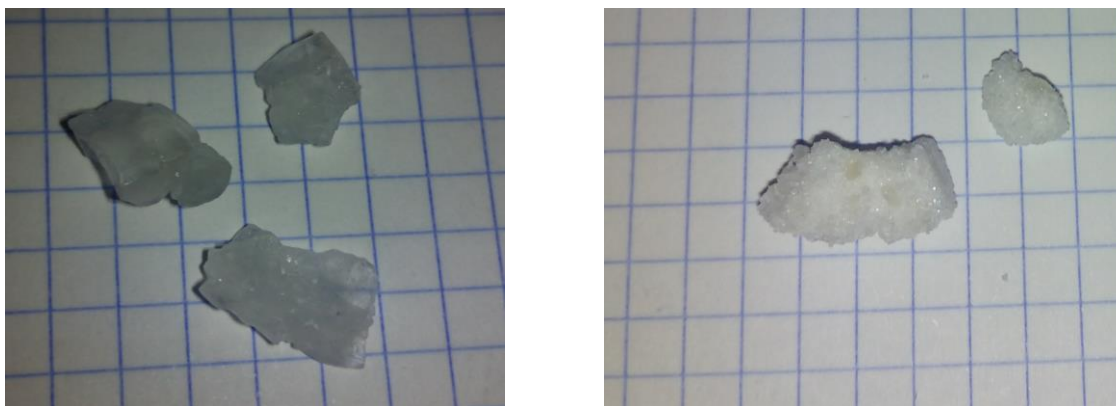


Figura 5.2 Cristalls obtingut experimentalment de la glicina àcida (esquerra) i zwitterió (dreta).
Font: pròpia.

5.1.2. Quelats de glicina amb ferro

Pel que fa a la reacció de formació de quelats de glicina amb ferro, es van obtenir dos cristalls de glicina als següents pH: àcida a 3.03 i zwitterió 5.89.

L'aspecte del cristall del quelat de glicina amb ferro és d'un to verdós, semblant al producte sulfat de ferro i de forma granular (Figura 5.3). Aquest color pot venir donat pel ferro present.



Figura 5.3 Cristalls obtinguts experimentalment del quelat de glicina amb ferro. Àcida: (esquerra) i zwitterió: (dreta). Font: pròpia.

5.1.3. Quelats de glicina amb zinc

Pel que fa a la reacció de formació de quelats de glicina amb zinc, es van obtenir dos cristalls de glicina als següents pH: àcid a 3,30 i zwitterió a 6,46.

L'aspecte del cristall del quelat de glicina amb zinc té aspecte de vidre, color translúcid, no granular i de color semblant al sulfat de zinc (Figura 5.4).

Pel que fa al quelat de glicina amb zinc a pH zwitterió, l'aspecte del cristall és més opac que l'àcid (Figura 5.4).



Figura 5.4 Cristalls obtingut experimentalment del quelat de glicina amb zinc: àcida (esquerra) i zwitterió (dreta). Font: pròpia.

5.2. Interpretació de resultats

5.2.1. Representació dels espectres de la glicina

En aquest apartat, es troben representats i assignats els espectres de la glicina a diferents pH, dels cristalls obtinguts experimentalment.

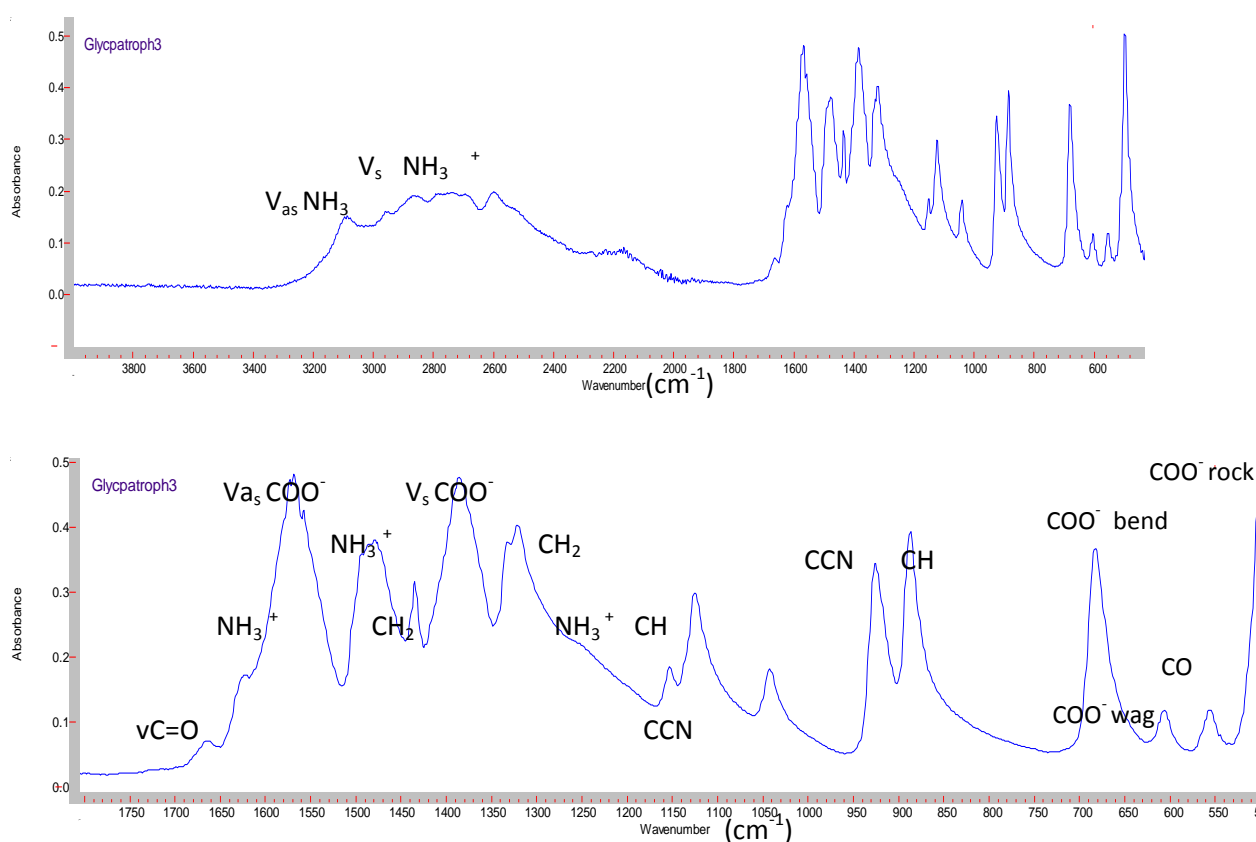


Figura 5.5 Espectre de FTIR de la glicina a pH 3,03 que compren el rang de 4000-400 cm^{-1} (representació general) i entre 1800-500 cm^{-1} (per l'estudi en específic de la zona).

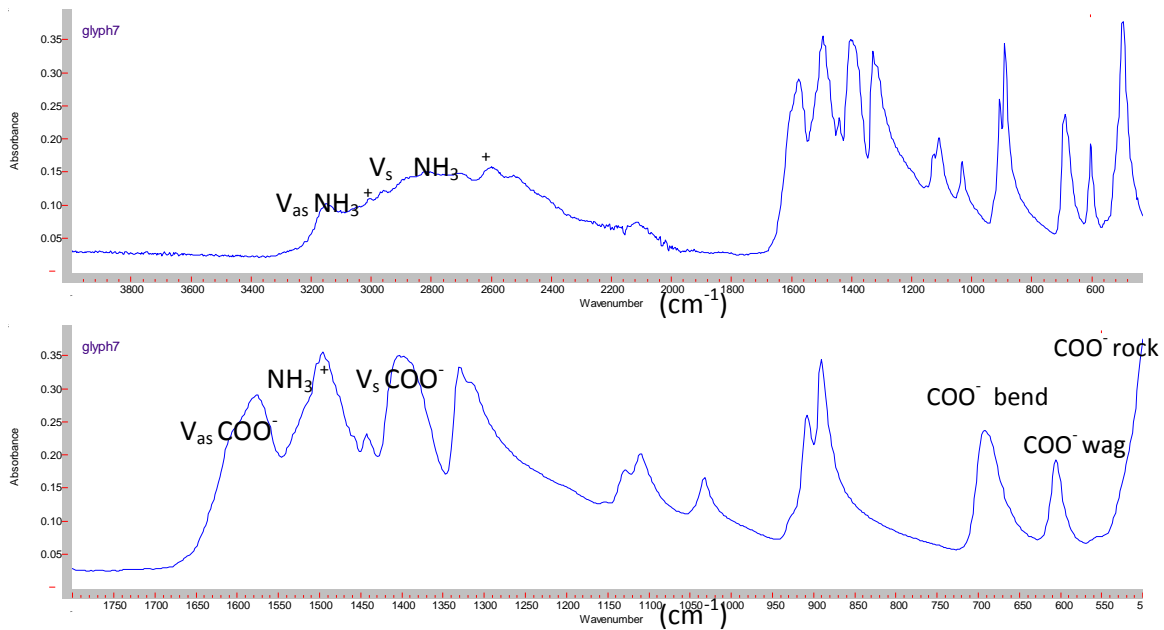


Figura 5.6 Espectre de FTIR de la glicina a pH 6,20 que compren el rang de 4000-400 cm^{-1} (representació general) i de 1800-500 cm^{-1} (per l'estudi en específic de la zona).

5.2.2. Espectres de glicina

Regió per sobre de 2000 cm⁻¹:

NH₃⁺ i CH₂ : En l'espectre d'infraroig de la glicina àcida i zwitterió (figures 5.5 i 5.6), s'observa que en el pic centrat a 3100 cm⁻¹, l'enllaç NH₃⁺ i en el 2898 cm⁻¹ es pot assignar al pic CH₂ o NH₃⁺ (Ramasamy et al. 2010; Rosado et al, 1998).

NH₃⁺ : La banda que corresponent a l'enllaç NH₃⁺, es troba en una zona àmplia entre el 3400-2400 cm⁻¹. Aquesta franja es mostra involucrada en varis sobretons de les bandes d'estirament dels grups CH₂ (Dhanaraj et al. 2009; Rosado et al. 1998).

Regió 2000-1400 cm⁻¹:

Aquesta regió de l'espectre en la glicina àcida i zwitterió, inclou les bandes del carbonil (C=O), NH₃⁺, CH₂ i els dos modes carboxilats protonat (COOH) i desprotonat (COO⁻).

- La banda del carbonil en la glicina àcida (Figura 5.5), es troba present al pic 1640 cm⁻¹. El carbonil apareix com un pic de baixa intensitat, degut segurament, a efectes intermoleculars que tendeixen a reduir la freqüència d'aquesta vibració (Barlow et al. 1998; Linder et al. 2008; Rosado et al. 1998). Tot i que no es trobi en la franja esperada, el carbonil fa que aparegui un doblet de banda amb l'enllaç C-C al 890 cm⁻¹.

-El pic centrat aproximadament entre 1515-1490 cm⁻¹ pertany al grup NH₃⁺ (Figures 5.5 i 5.6) d'ambdues formes de la glicina (Baran et al, 2005; Baraniraj et al. 2011; Ibrahim et al. 2005; Ivanova 2006). L'enllaç CH₂ es presenta en les dues figures de la glicina (Figures 5.5 i 5.6), sobre el número d'ona 1460 cm⁻¹ (Baraniraj et al. 2011; Ibrahim et al. 2005; Ivanova 2006).

-El pic entre 1629-1580 cm⁻¹ correspon a la vibració de vas COO⁻ de la glicina (Figures 5.5 i 5.6). Per part del pic 1400-1419 cm⁻¹ correspon s'assigna a vs COO⁻ (Budiasih et al. 2013; Ivanova 2006; Rosado et al, 1998).

-El número d'ona 1334 cm⁻¹ es mostra l'enllaç CH₂, segons (Ivanova 2006), el qual comparteix resultat amb els obtinguts de forma experimental de les formes analitzades (Figures 5.5 i 5.6).

Regió 1400-800 cm⁻¹

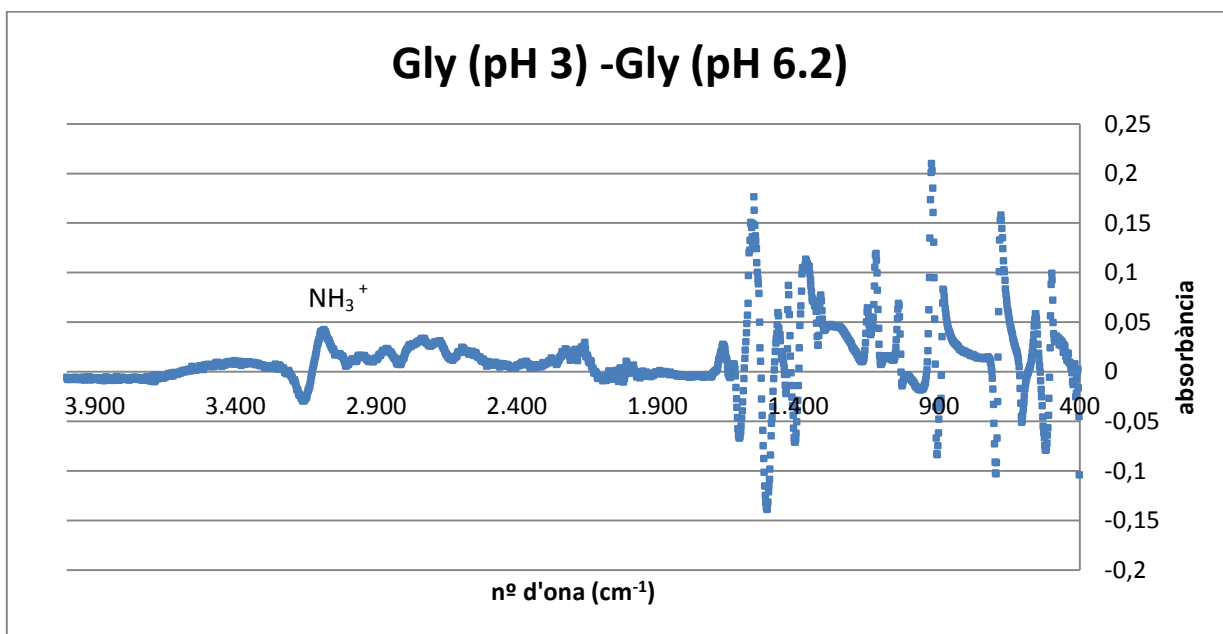
En les figures 5.5 i 5.6 de la glicina àcida i zwitterió, es pot observar el següent: el pic 1140 cm⁻¹ s'assigna a l'enllaç NH₃⁺, i el centrat a 1120 cm⁻¹ a l'enllaç CH. Pel que fa a 1030 cm⁻¹ s'assigna a (vas CN + vCC), al número d'ona 905 cm⁻¹ s'assigna a les vibracions vs CCN i 875 cm⁻¹ al (pCH₂ + pNH₃ + ωCOO⁻). Segons les fonts (Baran et al. 2005; Ivanova 2006; Kumar et al. 2005).

Per sota de 800 cm⁻¹

Per sota de 800 cm⁻¹ de la glicina (figures 5.5 i 5.6), els diferents pics trobats en 685, 600 i 503cm⁻¹ corresponen a diverses vibracions del carboxil (COO⁻). El pic situat a 560 cm⁻¹ de la glicina àcida (Figura 5.5) s'ha assignat com a carbonil (Hernández-Paredes et al. 2008; Ivanova 2006; Linder et al. 2008).

5.2.2.1. Interpretació dels espectres de la glicina.

La interpretació de la glicina àcida i zwitterió es veu a les figures 5.5 i 5.6 respectivament. Per a poder veure el comportament del grup amino i carboxil entre el pH àcid 3 i zwitterió 6,8 de la glicina, s'ha realitzat una comparació dels diferents espectres, mitjançant les diferències entre les absorbàncies com s'observa en la figura 5.7.



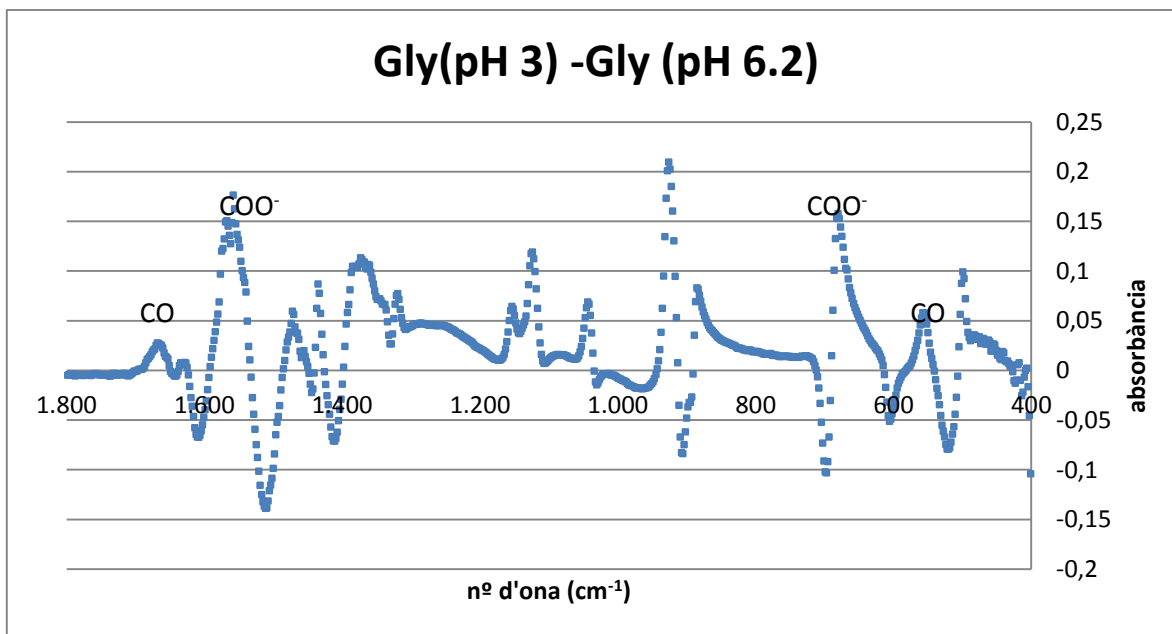


Figura 5.7 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina àcida i zwitterió. En el rang de 4000-400 cm^{-1} (representació general) i de 1800-400 cm^{-1} (per estudi en específic de la zona).

Regió per sobre de 2000 cm^{-1} :

En la franja per sobre de 2000 cm^{-1} de la glicina àcida respecte el zwitterió, es troben situats els pics de NH_3^+ protonats al 3100 i 2900 cm^{-1} . El grup amino es dissocia a pK_a superior a 9,8. Els valors en aquesta franja de la figura són pròxims al zero, per tant, no es troben diferències i es pot dir que no hi ha un canvi de grup del NH_3^+ al passar de pH àcid a zwitterió.

Regió 2000-1400 cm^{-1} :

Aquesta regió de l'espectre en la glicina àcid i zwitterió de la figura 5.7, inclou les bandes del carbonil ($\text{C}=\text{O}$), NH_3^+ i els dos modes carboxilats (vs i vas COO^-) compresos també en la glicina àcida.

- En el pic 1640 cm^{-1} (Figura 5.7) s'assigna com a carbonil ($\text{C}=\text{O}$), dímer del carboxil protonat (COOH) en l'espectre de la glicina àcida. Es troba en baixa intensitat, degut a efectes intermoleculars que tendeixen a reduir la freqüència d'aquesta vibració (Barlow et al. 1998; Rosado et al. 1998). La glicina zwitterió indica que el carboxil està desprotonat perquè no té absorbància.

- Els pics 1558 i 1381 cm^{-1} corresponen a les vibracions del grup carboxil desprotonat (COO^-). El carboxil es dissocia a un pK_a superior a 3, per això, la glicina zwitterió estant en un pH de 6,2 el carboxil es troba de manera desprotonada (Figura 5.5). Observant aquests pics del grup carboxil desprotonat (Figura 5.7) es conclou que la glicina àcida es troba en forma d'agregat. El límit de

canvi de protonació es fixa a pH 2,6 i la glicina experimental està a pH 3,03. Per tant, una part del grup carboxil està protonat i l'altre no. (Ivanova 2006; Rosado et al, 1998; Budiasih et al. 2013).

- En el rang $1490\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$ de la glicina àcida i zwitterió (Figures 5.5 i 5.6), s'assigna el pic comprès per NH_3^+ protonat. Com l'amino es dissocia a un pKa superior de 9,8 i la glicina àcida i zwitterió estan per sota d'aquest límit, no s'observa canvis en aquest grup (Figura 5.7). (Baran et al. 2005; Cuevas et al. 1999; Ibrahim et al. 2005; Ivanova 2006).

Per sota de 800 cm^{-1}

Per sota de 800 cm^{-1} en la glicina àcida i zwitterió (figures 5.5 i 5.6), els diferents pics trobats en ($685, 600$ i 503 cm^{-1}), corresponen a diverses vibracions del carboxil desprotonat (COO^-).

Pel que fa a la glicina àcida (Figura 5.4) en el pic 680 cm^{-1} hi ha una desproporció en la freqüència del carboxil respecte la glicina zwitterió (Figura 5.5). Però, al pic 600 cm^{-1} de la glicina zwitterió succeeix l'oposat, es troba amb més freqüència que no pas la glicina àcida (Figura 5.7). El motiu pel qual la glicina àcida té una part del grup carboxil desprotonat és la mateixa que a la regió de 1558 i 1381 cm^{-1} , on es troba de forma agregada.

D'altra banda, el pic 550 cm^{-1} de la glicina àcida (Figura 5.5), correspon a l'absorció del carbonil (carboxil protonat), observat només a pH àcid. Aquest fet no succeeix a la glicina zwitterió, que té el grup carboxil desprotonat (Figura 5.7). (Hernández-Paredes et al. 2008; Ivanova 2006).

5.2.3. Quelat de glicina amb ferro

En aquest apartat, es troben representats i assignats els espectres dels quelats de glicina amb ferro a diferents pH, dels cristalls obtinguts experimentalment.

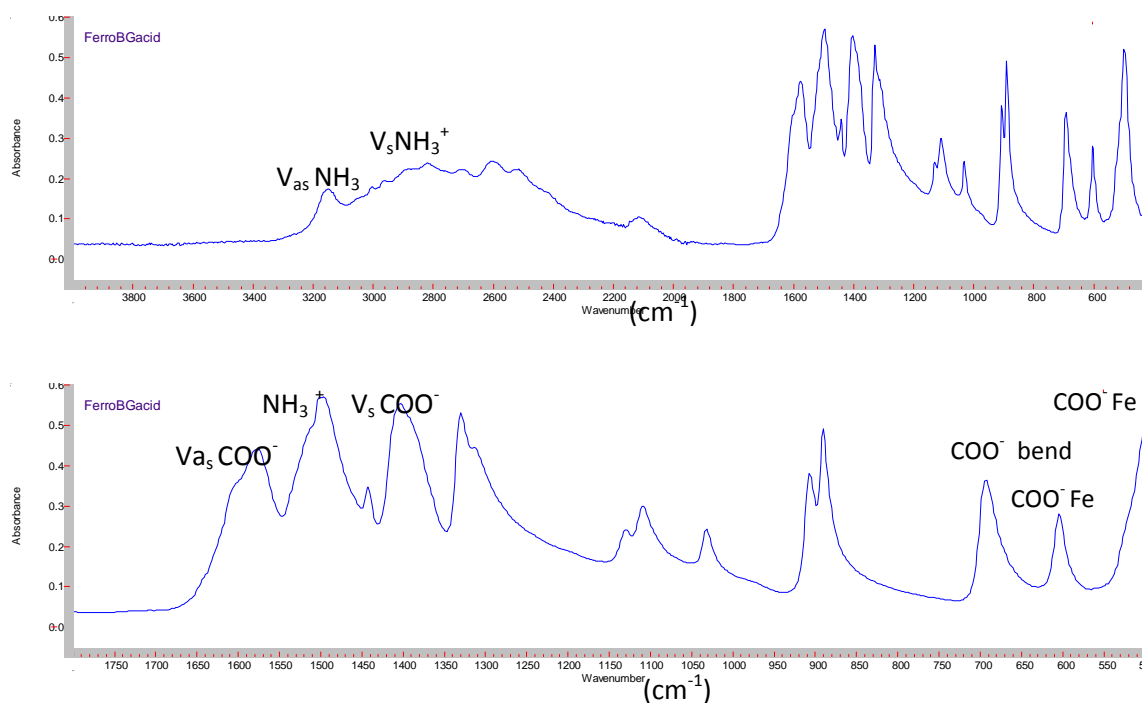


Figura 5.8 Espectre de FTIR del quelat de glicina amb ferro a pH 3,03 que compren el rang de 4000-400 cm⁻¹ (representació general) i de 1800-500 cm⁻¹ (per l'estudi en específic de la zona).

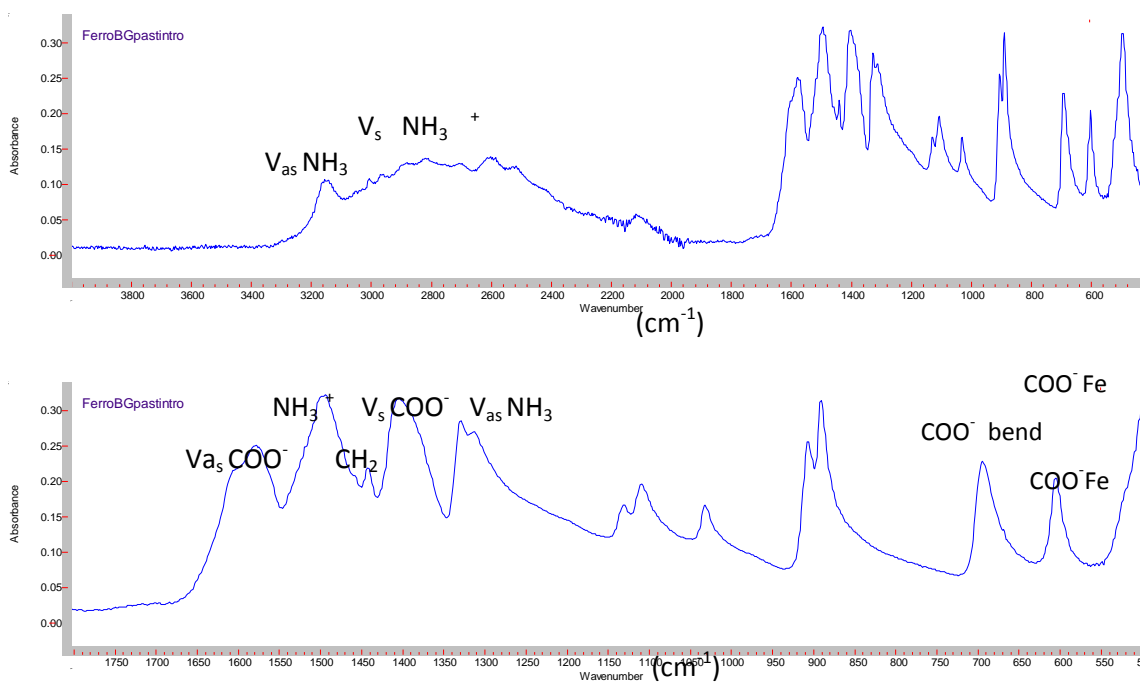


Figura 5.9 Espectre de FTIR del quelat de glicina amb ferro a pH 5,89 que compren el rang de 4000-400 cm^{-1} (representació general) i de 1800-500 cm^{-1} (per l'estudi en específic de la zona).

5.2.3.1. Interpretació de l'espectre del quelat de glicina amb ferro

Per a poder veure l'estat de protonació del grup amino i carboxil entre el pH àcid i zwitteriò amb el ferro, s'ha realitzat una comparació dels diferents espectres, mitjançant les diferències entre les absorbàncies com s'observa en la figura 5.10 i 5.11.

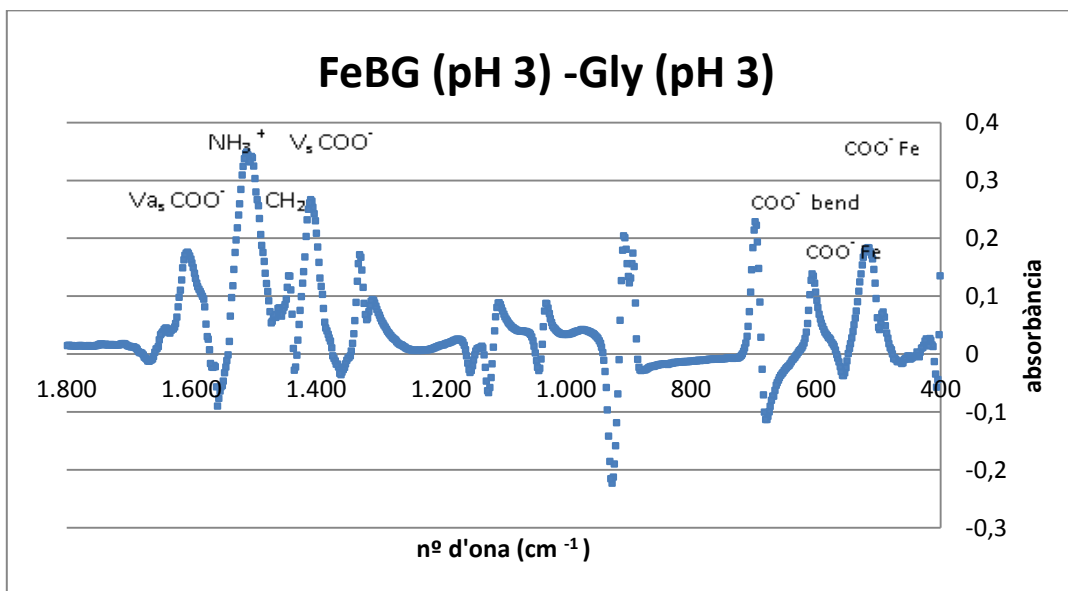
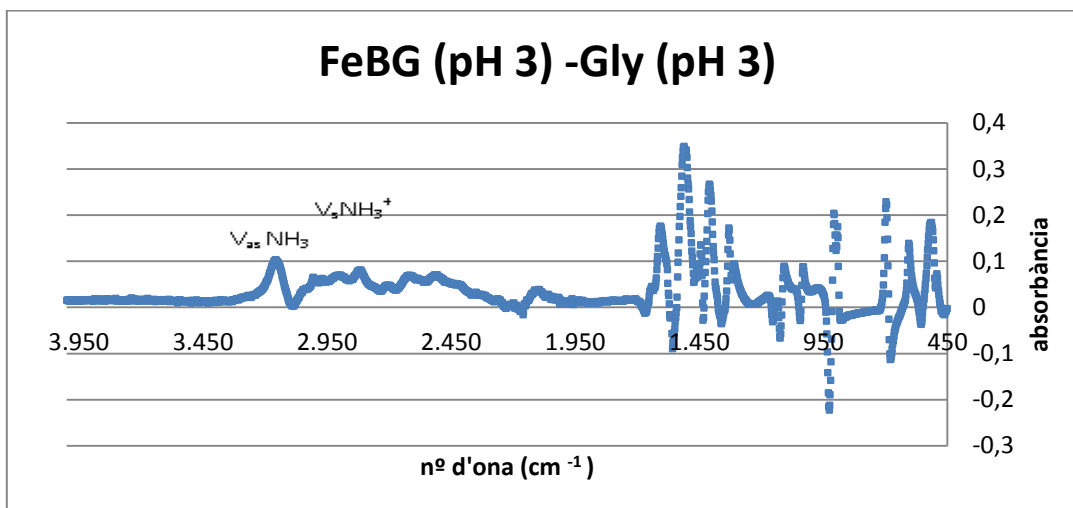


Figura 5.10 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada de ferro àcida (FeBG) i de la glicina àcida (Gly). En el rang de 4000-400 cm^{-1} (representació general) i de 1800-400 cm^{-1} (per estudi en específic de la zona).

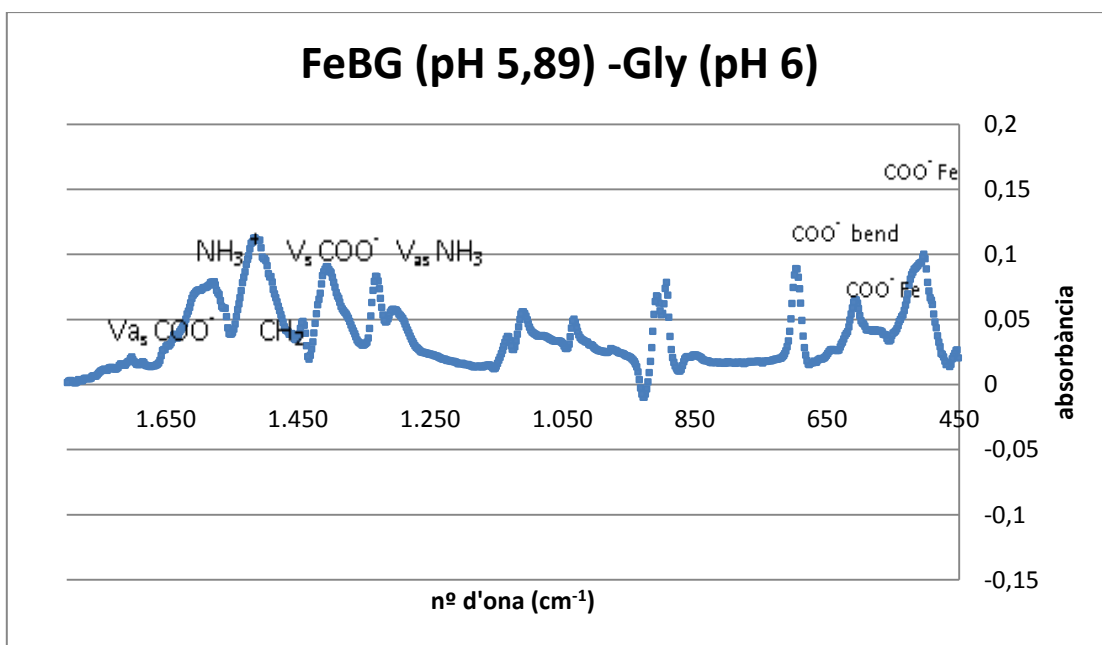
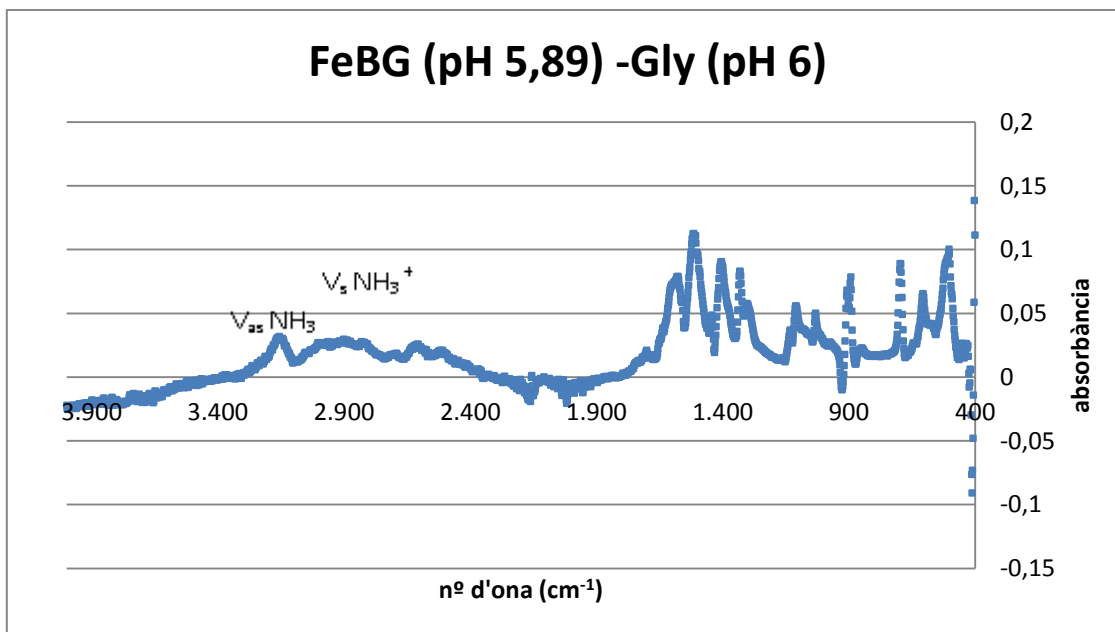


Figura 5.11 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb ferro zwitterió (FeBG) respecte de la glicina zwitterió (Gly). En el rang de 4000-400 cm⁻¹(representació general) i de 1800-400 cm⁻¹ (per estudi en específic de la zona).

Regió per sobre de 2000 cm⁻¹:

NH₃⁺: L'estat de protonació de l'amino de la glicina, en la regió per sobre de 2000 cm⁻¹, es troba de manera protonada en aquesta franja de l'infraroig (Figures 5.5 i 5.6).

A la regió superior a 2000 cm⁻¹ de les figures 5.10 i 5.11, no s'aprecien diferències clares. La presència d'un ió com és el ferro, amb la glicina en pKa inferiors al de dissociació (9,8) en l'amino, representa que no ha variat en la presència del ferro. El NH₃⁺ de la glicina es manté a la forma d'amino protonada (NH₃⁺), segons (Gómez et al. 2003; Rosado et al. 1998).

Regió 2000-1400 cm⁻¹:

Aquesta regió de l'espectre inclou les bandes del NH₂ i NH₃⁺, CH₂ i els dos modes carboxilats (vs i vas COO⁻).

Una de les raons de perquè el grup carboxil s'uneix a l'ió ferro, es troba en l'absorbància 1700-1750 cm⁻¹ de la figura 5.10. En un pH àcid < 3 com succeeix en la glicina àcida (Figura 5.5), el grup carboxil en aquest pic es troba de forma protonada. Amb el mateix pH però afegint el catió ferro (Figura 5.8) no té absorbància en el pic 1700-1750 cm⁻¹. Segueix el model d'equació 5-2, el ferro s'ha dissociat desplaçant l'hidrogen quedant unit al carboxil que està desprotonat (Figures 5.10 i 5.11).

- El pic centrat a 1577 cm⁻¹ del quelat de glicina en forma àcida i zwitterió amb ferro, correspon a la vibració de vas COO⁻. En les figures 5.8 i 5.9 el pic del cristall de ferro es troba millor definit i amb un increment d'absorbància respecte al de la glicina (Figures 5.5 i 5.6).

- El pic centrat a 1497 cm⁻¹ del quelat de glicina en forma àcida i zwitterió amb ferro correspon a l'amino protonat. Presenta una absorbància més intensa en presència del catió respecte la glicina àcida (Figura 5.10). Aquest pic s'assembla més a la glicina zwitterió (Figura 5.6) respecte a la presència de catió (Figura 5.8). Per tant, al no haver un canvi representatiu en les figures 5.10 i 5.11 no es pot concloure que el ferro s'uneixi a l'amino.

- El pic centrat a 1405 cm⁻¹ s'assigna al grup COO⁻ atribuït al cristall ferro àcid i zwitterió (Figures 5.8 i 5.9). Respecte la glicina, aquest pic no presenta un desdoblament de l'enllaç i sembla que el ferro no està unit als dos oxígens del carboxil.

Per sota de 800 cm⁻¹

Per sota de 800 cm⁻¹ es corresponen les diverses vibracions del carboxil de la glicina (Figures 5.5 i 5.6). Com s'ha vist, en la figura 5.5 la forma predominant al pic 550 cm⁻¹ amb un pKa < 2,8 és la forma protonada del carboxil (COOH). En canvi, tal com s'observa en la figura 5.10, en aquest pic no es troba present la forma protonada, ja que l'ió de ferro s'ha unit amb el carboxil (Figures 5.10 i 5.11).

Per tant, es pot afirmar que l'ió de ferro es troba unit al carboxil i no pas a l'amino. L'estructura resultant és:

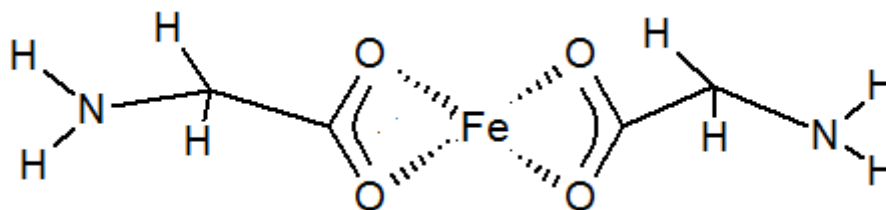


Figura 5.12 Estructura proposada per el mineral quelat de glicina amb ferro. Font: pròpia.

5.2.4. Quelat de glicina amb zinc

En aquest apartat, es troben representats i assignats els espectres dels quelats de glicina amb zinc a diferents pH, dels cristalls obtinguts experimentalment.

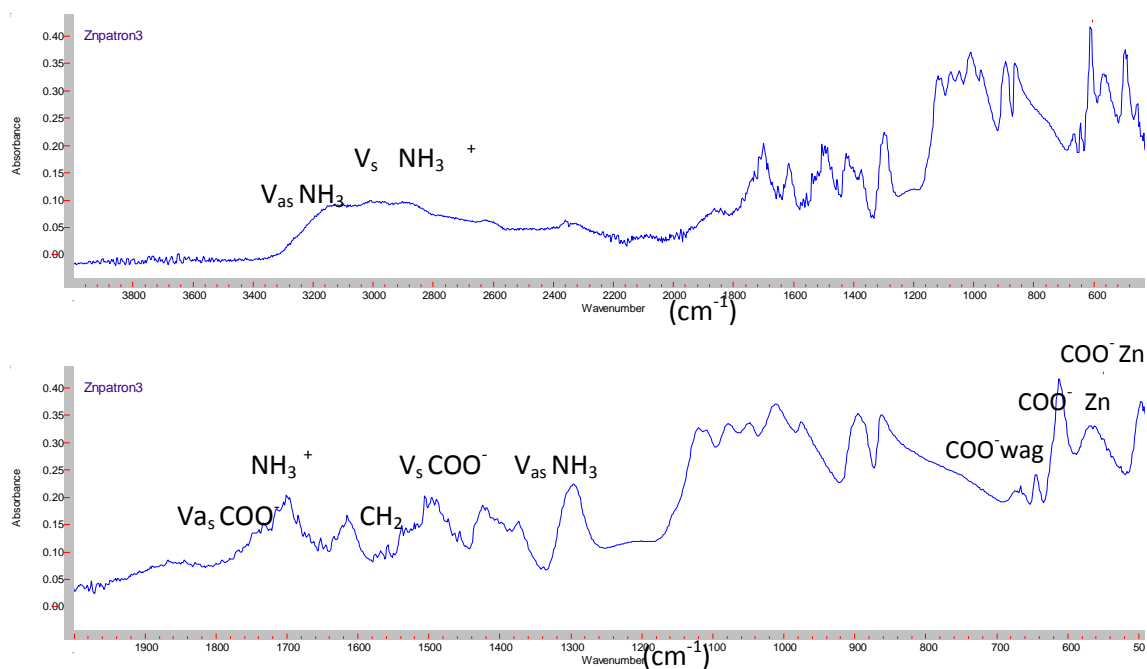


Figura 5.13 Espectre de FTIR del quelat de glicina amb zinc a pH 3,3 que compren el rang de 4000-400 cm^{-1} (representació general) i de 1800-500 cm^{-1} (per l'estudi en específic de la zona).

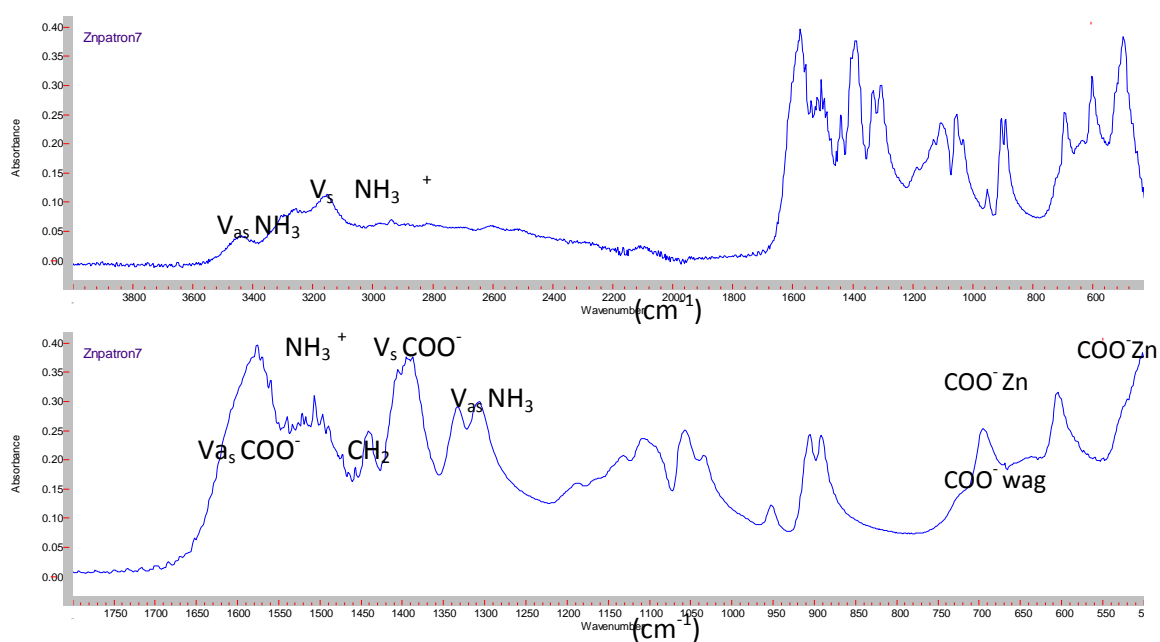


Figura 5.14 Espectre de FTIR del quelat de glicina amb zinc a pH 6,58 que compren el rang de 4000-400 cm^{-1} (representació general) i de 1800-500 cm^{-1} (per l'estudi en específic de la zona).

5.2.4.1. Interpretació de l'espectre del quelat de glicina amb zinc

Per poder veure l'estat de protonació del grup amino i carboxil entre el pH àcid i zwitteriò amb el zinc, s'ha realitzat una comparació dels diferents espectres, mitjançant les diferències entre les absorbàncies com s'observa en la figura 5.15 i 5.16.

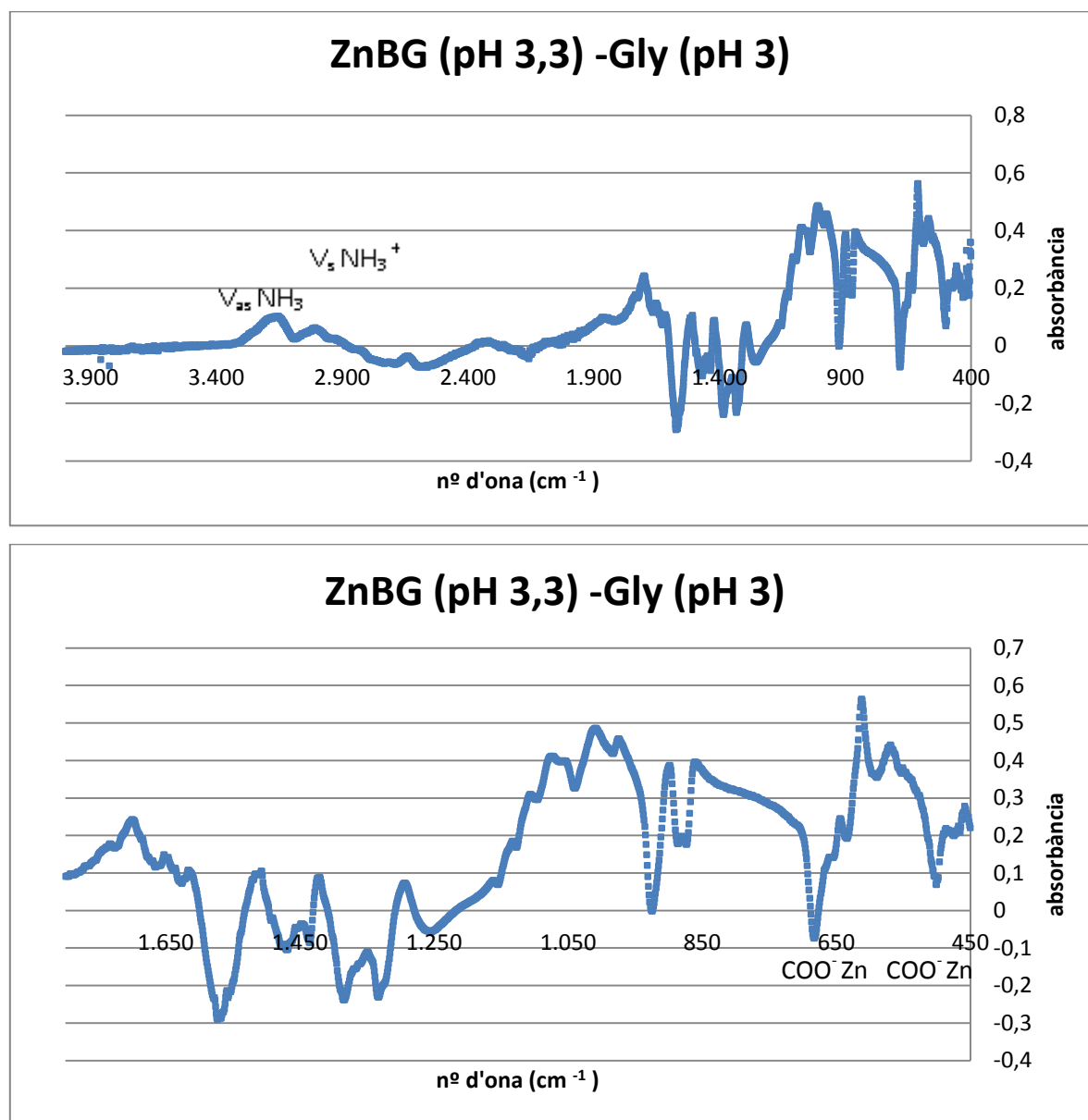


Figura 5.15 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb zinc (ZnBG) respecte la glicina àcida (Gly). En el rang de 4000-400 cm^{-1} (representació general) i de 1800-400 cm^{-1} (per estudi en específic de la zona).

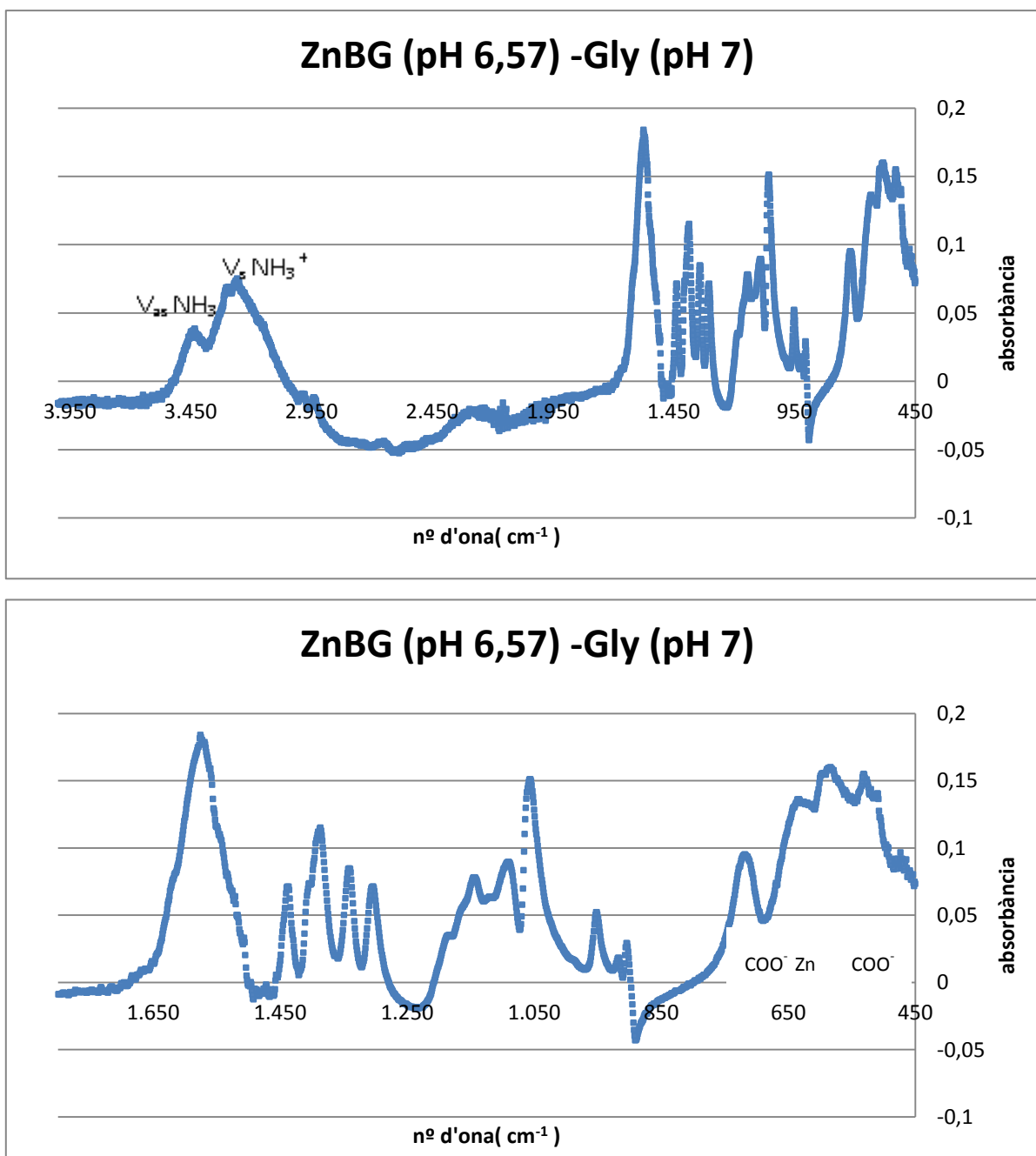


Figura 5.16 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb zinc zwitteriò (ZnBG) respecte la glicina zwitteriò (Gly). En el rang de 4000-400 cm⁻¹(representació general) i de 1800-400 cm⁻¹ (per estudi en específic de la zona).

Regió per sobre de 2000 cm⁻¹:

L'estat de protonació de l'amino de la glicina a pH àcid i zwitterió, en la regió per sobre de 2000 cm⁻¹, es troba en forma protonada (Figures 5.5 i 5.6).

A la regió per sobre de 2000 cm⁻¹ de les figures 5.15 i 5.16, es mostren diferències en l'espectre infraroig quan es troba amb el catió, respecte a quan es troba la glicina sola a ambdós pH. L'ió zinc s'uneix a l'amino (Figures 5.15 i 5.16) en el pic 3350 i 3200 cm⁻¹, ja que s'observa un increment de freqüència en aquest pic de l'espectre a favor de la glicina amb el catió.

Regió 2000-800 cm⁻¹:

En aquesta regió de 2000 a 1400 cm⁻¹, el grup carboxil de la glicina en pH àcid es troba protonat (Figura 5.5) i quan el pKa és superior a 2,8 està desprotonat glicina zwitterió (Figura 5.6). Pel que fa a la figura 5.16 al trobar-se en un pH àcid, no sembla que l'ió de zinc es trobi unit al carboxil, degut a que en el pic 1750 cm⁻¹ apareix la forma protonada del mateix (Figura 5.13). Les altres formes de vibració del carboxil d'aquesta zona (Figura 5.13) es troben de la mateixa manera que en la glicina àcida (Figures 5.5 i 5.16).

El grup amino d'aquesta regió al pic 1497 cm⁻¹ (Figures 5.15 i 5.16) mostra que tot i que es presenta amb una absorbància més intensa respecte al de la glicina, no s'uneix amb el catió i es troba de forma protonada. Això és degut a que el pKa és inferior a 9,8 i es troba en forma de NH₃⁺.

El gran canvi observat a la banda de 1200 a 800 cm⁻¹ en l'espectre del zinc àcid (Figura 5.15), respecte l'espectre de la glicina àcida pot ser deguda a la proximitat de l'enllaç CH₂ i COOH de les diferents molècules formen una agregació. En aquesta franja, el catió de zinc pot estar lligat a un carbonil degut a la seva densitat de càrrega.

En el cristall de zinc zwitterió (Figura 5.16) es troba un amino desprotonat al pic 950 cm⁻¹.

Per sota de 800 cm⁻¹

Per sota de 800 cm⁻¹ en el quelat de glicina àcid amb zinc (Figura 5.13) s'observen alguns canvis respecte l'espectre de la glicina àcida (Figura 5.5).

- A la figura 5.16, el pic 695 cm⁻¹ desapareix ja que el carboxil es troba unit a l'ió zinc.
- El grup carbonil que s'observa en el pic 560 cm⁻¹ de la glicina àcida (Figura 5.5) desapareix, perquè no es troba protonat ja que s'uneix amb el catió de zinc (Figura 5.13).
- Pel que fa al pic 503 cm⁻¹ no s'hi produeix variacions entre la forma àcida i zwitterió de la glicina amb el zinc (Figures 5.15 i 5.16), com l'espectre del pic no canvia es situa al grup carboxil.

Després de tota la discussió, el que es pot desprendre és que el zinc es troba quelat al grup amino via NH_2 i pel grup carboxil, tal i com es mostra a la figura 5.17.

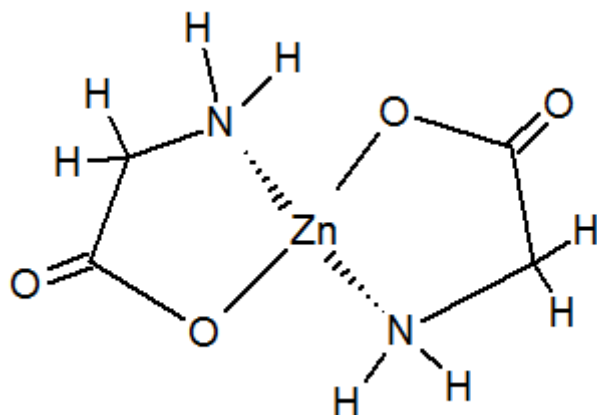


Figura 5.17 Estructura proposada pel mineral quelat de glicina amb zinc. Font: pròpia.

5.3. Discussió entre un quelat de glicina amb ferro i zinc

Com s'ha explicat amb anterioritat, durant el treball s'han analitzat quelats de glicina i zinc comercials. Aquests quelats tal com s'explica en l'apartat de materials (4.1.1.7) poden ser útils per a la comprovació dels lligands entre els resultats obtinguts dels quelats de zinc i ferro experimentals (Figures 5.18 i 5.19).

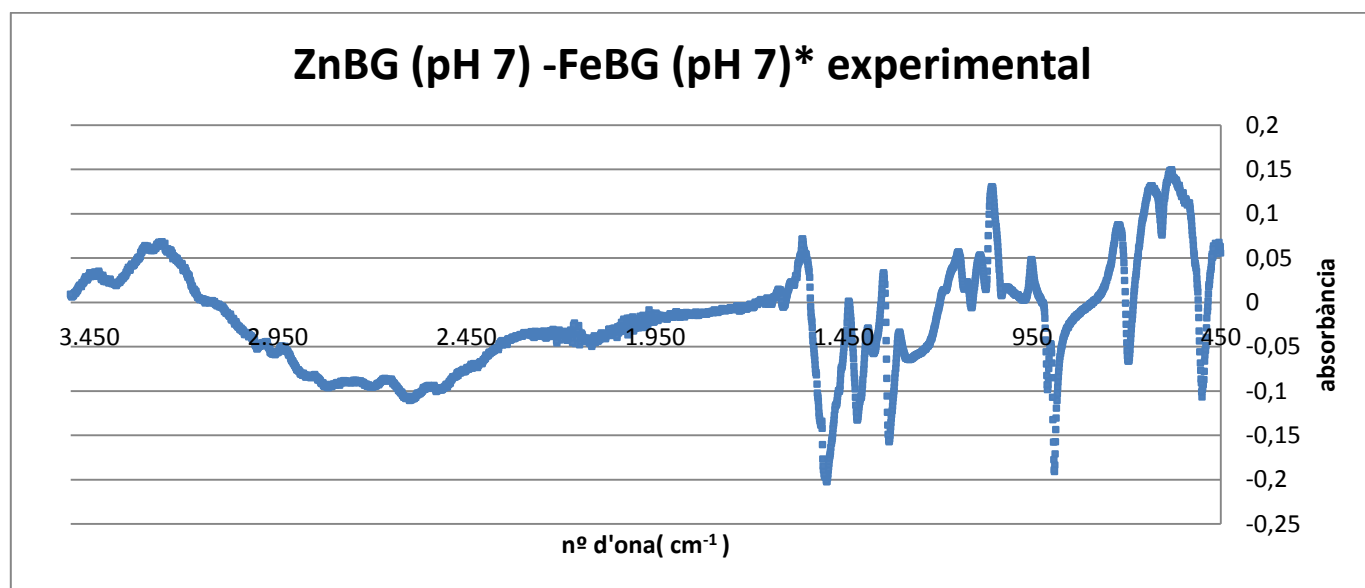


Figura 5.18 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb zinc zwitterió respecte la forma quelada de ferro zwitterió experimental.

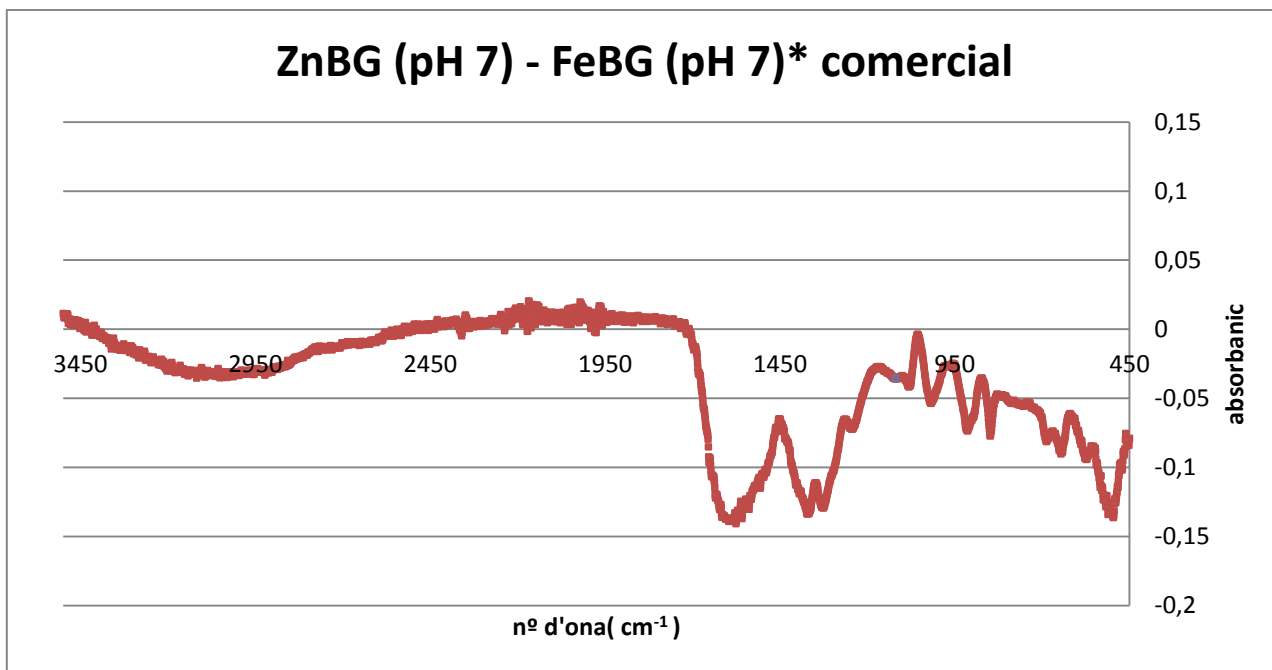


Figura 5.19 Diferència de les absorbàncies, entre els espectres de la glicina quelada amb zinc respecte ferro comercial.

Regió per sobre de 2000 cm^{-1} :

A la regió per sobre de 2000 cm^{-1} de les figures 5.18 i 5.19, és la banda on hi ha les diverses vibracions del grup amino. Tant en l'exemple experimental com el comercial (Figures 5.18 i 5.19), s'observa com difereix la regió que correspon al quelat de glicina amb zinc. Ja que com s'ha explicat en l'apartat i 5.2.3.1 i 5.2.4.1, l'ió ferro no està unit a l'amino com l'ió zinc.

Regió 2000-1400 cm^{-1} :

Aquesta regió de l'espectre infraroig de les figures 5.18 i 5.19 inclou les bandes del NH_2 i NH_3^+ , CH_2 i els dos modes carboxilats (vs i vas COO^-) es troben assignats als apartats 5.2.3.1 i 5.2.4.1.

No es pot definir amb exactitud els pics d'aquesta regió de l'espectre ja que les (Figures 5.18 i 5.19) es troben desplaçades a la banda del quelat de glicina amb ferro. No influeix alhora de reconèixer els diferents pics, ja que en molts pics d'aquesta regió poden ser combinacions de varis enllaços, fent que la presència d'un pic tampoc fos determinant. Però, es pot veure com en el pic 1700 cm^{-1} assignat a la forma protonada del carboxil de la glicina àcida (Figura 5.5) no té presència en les figures experimentals i comercials (Figures 5.18 i 5.19). La seva absència en aquest pic demostra que el ferro i el zinc s'uneixen al carboxil.

Per sota de 800 cm⁻¹

Per sota de 800 cm⁻¹ en el quelat de glicina de ferro i zinc experimental i comercial (Figures 5.18 i 5.19), corresponen a les diverses vibracions del carboxil (COO⁻) junt amb el catió assignades en els apartats 5.2.3.1 i 5.2.4.1.

El que es pot observar d'ambos figures 5.18 i 5.19 és que els cations de ferro i zinc s'uneixen al carboxil. Ja que desapareix el grup carboxil protonat, present en la forma de la glicina àcida en el pic 550 cm⁻¹ (Figura 5.5).

6. Conclusions

Un cop obtinguts els resultats dels espectres de glicina i dels quelats de glicina amb zinc i ferro, se'n poden extreure les següents conclusions:

S'han obtingut cristalls de glicina i quelats de glicina amb ferro i zinc, per l'anàlisi experimental a pH àcid i zwitterió amb els pH següents :

- Cristalls de glicina a pH 3,03 i 6,42.
- Cristalls de glicina amb el catió ferro a pH 3,03 i 5,89.
- Cristalls de glicina amb el catió zinc a pH 3,30 i 6,46.

La interpretació de l'espectre de la glicina:

- S'afirma que en el grup amino no s'aprecien diferències de canvi de grup del NH_3^+ al passar de pH àcid a zwitterió de la glicina.
- S'ha pogut veure que les vibracions del grup carboxil de la glicina zwitterió es troben de manera desprotonada (COO^-).
- En canvi en la glicina àcida es poden trobar les formes protonades i desprotonades del carboxil.

La interpretació de l'espectre de la glicina amb ferro:

- S'ha vist que l'amino no es troba unit amb l'ió ferro del quelat de glicina amb ferro, es manté a la forma d'amino protonada (NH_3^+).
- S'afirma que el grup carboxil es troba unit a l'ió ferro, gràcies a l'observat en els espectres de la glicina amb i sense l'ió ferro.

La Interpretació de l'espectre de la glicina amb zinc:

- L'amino de la glicina en contacte amb l'ió zinc, es comporta de manera desprotonada i per tant s'afirma que s'uneix amb el catió.
- Pel que fa al carboxil de la glicina quan es troba amb l'ió zinc, es comporta d'igual forma que el grup amino, és a dir, l'ió zinc s'uneix al carboxil.

Un cop feta la interpretació dels quelats de glicina amb ferro i zinc, es pot concloure que cada catió s'uneix de diferent manera amb la glicina. Per tant, no comparteixen la mateixa caracterització estructural inicialment esperada.

Bibliografia

- Abril Díaz, Nieves, Bárcena Ruiz J. Antonio, Fernández Reyes, Emilio, Galván Cejudo, Aurora et al. 2010. "Espectrofotometría: Espectros de Absorción Y Cuantificación Colorimétrica de Biomoléculas." *Campus Universitario de Rabanales. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular* 1: 1–8.[En línia]. [Data de consulta: 04 setembre 2015]. Disponible a: http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf.
- Ai, Hongqi, Bu, Yuxiang, Li, Ping, Hu, Xiangquan i Chen, Zhida. "Geometry and Binding Properties of Different Multiple-State Glycine-Fe⁺/Fe²⁺ Complexes." *Journal of Physical Organic Chemistry* 18(1): 26–34. 2005. Disponible a: <http://doi.wiley.com/10.1002/poc.808>.
- Ashmead, H. D. *The Roles of Amino Acid Chelates in Animal Nutrition*. Noyes publication. ISBN:0-8155-1312-7. 1993.
- Baran, Jan, and Henryk Ratajczak. "Polarised IR and Raman Spectra of the γ -Glycine Single Crystal." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61(7): 1611–26. 2005.
- Baraniraj, T, and P Philominathan. "Growth and Characterization of Gamma Glycine Single Crystals Grown from Alpha Glycine in the Presence of Sodium Acetate." 10(4): 351–56. 2011. [En línia]. [Data de consulta: 15 maig 2016]. Disponible a: http://file.scirp.org/pdf/JMMCE20110400004_61748025.pdf.
- Barlow, S.M, K.J Kitching, S Haq, and N.V Richardson. "A Study of Glycine Adsorption on a Cu{110} Surface Using Reflection Absorption Infrared Spectroscopy." *Surface Science* 401(3):322–35. 3 Desembre 1998. [En línia]. [Data consulta: 19 maig 2016]. Disponible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039602897010868>.
- Budiasih, Kun Sri, Chairil Anwar, Sri Juari Santosa, and Hilda Ismail. "Synthesis and Characterization of Chromium (III) Complexes with L-Glutamic Acid , Glycine and L- Cysteine." *International science Index* 7(1ii): 1923–27. 2013. [En línia]. [Data de consulta: 19 maig 2016]. Disponible a: <http://waset.org/publications/15098/synthesis-and-characterization-of-chromium-iii-complexes-with-l-glutamic-acid-glycine-and-l-cysteine>.
- Cuevas, Alicia, Viera, Inés, H.Torre, María et al. "Infrared Spectra of the Copper (II) Complexes of Amino Acids with Hydroxylic Residues." *Acta Farm. Bonaerense* 56(3): 263–65. 7 maig 1998. [En línia]. [Data de consulta: 19 novembre 2015]. Disponible a: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033163988&partnerID=40&md5=9137e64dc55677ab057c59627e5ac2c3>.
- Dhanaraj, P. V., and N. P. Rajesh. "Growth and Characterization of Nonlinear Optical Gamma-Glycine Single Crystal from Lithium Acetate as Solvent." *Materials Chemistry and Physics* 115(1): 413–17. 15 Maig 2009. [En línia]. [Data de consulta: 15 març 2016]. Disponible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025405840801002X>.
- Ehu.eus. Diferents tipus de vibracions moleculars 28 Setembre 2016.[En línia][Consulta: 24 octubre 2016]. Disponible a: <<[<http://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/IR.htm>](http://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/IR.htm)>>.
- Elisabet Lázaro. Iron fortification without side effects. *Nutraceuticals Now*. 22 Febrer 2013. [En línia]. [Data de Consulta: 12 octubre 2015]. Disponible a:

<http://www.nutraceuticalsnow.com/articles/2013/02/22/ab-fortis-iron-fortification-without-side-effects/>.

Gandia, Peggy Dorothée Maurette, Jean Marc, Donazzolo, Yves Duchène. "A Bioavailability Study Comparing Two Oral Formulations Containing Zinc (Zn Bis-Glycinate vs. Zn Gluconate) after a Single Administration to Twelve Healthy Female Volunteers." *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 77(4): 243–48. 15. Gener 2007. [En línia]. [Data de consulta: 15 maig 2016]. Disponible a: https://www.researchgate.net/publication/5581403_A_Bioavailability_Study_Comparing_Two_Oral_Formulations_Containing_Zinc_Zn_Bis-Glycinate_vs_Zn_Gluconate_After_a_Single_Administration_to_Twelve_Healthy_Female_Volunteers.

Gómez-Zavaglia, a., and R. Fausto.. "Low-Temperature Solid-State FTIR Study of Glycine, Sarcosine and N,N-Dimethylglycine: Observation of Neutral Forms of Simple alfa-Amino Acids in the Solid State." *Physical Chemistry Chemical Physics* 5(15): 3154. 4 Juliol 2003. [En línia] [Data de consulta: 15 setembre 2016]. Disponible a: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2003/CP/B304888H#!divAbstract>.

Haro, Juan Francisco. "Biodisponibilidad de Diferentes Compuestos de Hierro Añadidos a Un Néctar de Fruta Funcional. Interacción Con Vitaminas Y Fructoligo Sacáridos. Murcia 2006. España. 263p." : 263. Disponible a: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/11061>.

Hernández-Paredes, J. Glossman-Mitnik, D. Ponce, Esperaza et al. "Band Structure, Optical Properties and Infrared Spectrum of Glycine-Sodium Nitrate Crystal." *Journal of Molecular Structure* 875(1-3): 295–301. 17 Maig 2008. [En línia]. [Data de consulta: 15 juny 2016]. Disponible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286007003663>.

Ibrahim, Medhat, Abdallah Nada, and Diaa Eldin Kamal. "Density Functional Theory and FTIR Spectroscopic Study of Carboxyl Group." *Indian Journal of Pure & Applied Physics* 43(December 2015): 911–17.

García Gómez, Alejandro. "Ingeniero Industrial Influencia Del Tratamiento Superficial Con Plasma Atmosférico En La Unión Estructural De Materiales Compuestos (Grp) Empleando Un Adhesivo Acrílico." Universidad Pontificia ICAI ICADE COMILLAS. Madrid juny 2011. Disponible a: <https://www.iit.comillas.edu/pfc/resumenes/4dea676006a3d.pdf>.

Ivanova, Bojidarka B. "Solid State Linear-Dichroic Infrared (IR-LD) Spectroscopic Characterization of α – and β – Glycine Polymorphs." *Central European Science Journals* 111–117. 2006. [En línia]. [Data de consulta: 15 agost 2016]. Disponible a: <https://www.degruyter.com/view/j/chem.2006.4.issue-1/s11532-005-0008-7/s11532-005-0008-7.pdf>.

United States Patent. "Process for determining of chelation in a dry mixture". Jennifer, Hartle, Ericson Clayton, and Ashmead Stephen D. 24. Juny 2003. Patent No US 7.144.737 B2 1(12).

The Efsa Journal. "Opinion of the Scientific Panel on Food Additives , Flavourings , Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission Related to Ferrous Bisglycinate as a Source of Iron for Use in the Manufacturing of Foods and in Food Sup." *The EFSA Journal* 299: 1–17. 6 Gener 2006. [En línia] [Data consulta: 15 agost 2016]. Disponible a: https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/299.pdf.

- Kumar, Santosh, Amareshwar K. Rai, V. B. Singh, and S. B. Rai. "Vibrational Spectrum of Glycine Molecule." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61(11-12): 2741–46. Setembre 2005. [En línia]. [Data de consulta: 15 Octubre 2016]. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2004.09.029>.
- R. Derrick Michele, Stulik, Dusan, M. Landry James. *Infrared Spectroscopy in Conservation Science*. Scientific tools for conservation.1999.[En línia] [Data consulta: 15 Octubre 2016]. Disponible a: <http://d2aohiyo3d3idm.cloudfront.net/publications/virtuallibrary/0892364696.pdf>.
- Linder, Rolf, Kai Seefeld, Andreas Vavra, and Karl Kleinermanns. "Gas Phase Infrared Spectra of Nonaromatic Amino Acids." *Chemical Physics Letters* 453(1-3): 1–6. 4 Gener 2008. [En línia] [Data de consulta: 15 Octubre 2016]. Disponible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261408000213>.
- Michael W King PhD | © 1996–2016 themedicalbiochemistrypage.org. 4 abril 2015. [En línia][Data de consulta: 24 octubre 2016]. Disponible a: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/amino-acids-sp.php>.
- Monteloeder. Fitxa tècnica L-glycine. 16 Gener 2015. .[En línia]. [Data de consulta: 22 març 2016]. Disponible a: http://www.monteloeder.com/pdf_specs/Specs_ML0223-SE0184.pdf.
- Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry, 5th ed, New York: W.H. Freeman Company; 2008: chapter 3.
- Nicolet, Thermo et al. 2001. "Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry." *A Thermo Electron Bussines*: 1–8. [En línia] [Data consulta: 15 abril 2016]. Disponible a: <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>.
- Oldewage-Theron, Wilna, and Zhengxing Chen. "Foof Fortification to Prevent and Control Iron Deficiency.pdf." *African Journal of Food and Nutritional Sciences*. Vol 2 No 2 Juliol 2002. [En línia]. [Data de consulta: 15 setembre 2015]. Disponible a: https://www.researchgate.net/publication/43554603_FOOD_FORTIFICATION_TO_PREVENT_AND_CONTROL_IRON_DEFICIENCY.
- Kreamer Klaus, B. Zimmermann Michael. *Nutritional Anemia*. Sight and life Press 2007. Switzerland. ISBN 3-906412-33-4.
- Peter, M. Esthaku, and P. Ramasamy. "Growth of Gamma Glycine Crystal and Its Characterisation." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 75(5): 1417–21. 2010. [En línia]. [Data de consulta: 03 febrer 2016]. Disponible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142510000557>.
- Pineda, Oscar, and H. DeWayne Ashmead. Effectiveness of Iron Deficiency Treatment in Children.pdf.". Elsevier Science Inc. 2001. Printed in USA. Nutrition Volume 17, No 5 2001. [En línia] [Data de consulta: 05 març 2016]. Disponible a: <http://www.ecosupp.co.il/wp-content/uploads/2014/08/Iron-def-anemia-infants-children-ferroys-bis-glycinate-chelate-nutr.pdf>.
- Rosado, Mário T, Maria Leonor T.S Duarte, and Rui Fausto."Vibrational Spectra of Acid and Alkaline Glycine Salts." *Vibrational Spectroscopy* 16 (1998): 35–54. [En línia] [Data de consulta: 15 gener 2016]. Disponible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203197000507>.
- Stuart, Barbara H. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley and

Sons,Ltd ISBN: 0-470-85427 (HB); 0-470-85428-6 (PB). 2004. [En línia]. [Data de consulta: 01 octubre 2016]. Disponible a: <http://www.kinetics.nsc.ru/chichinin/books/spectroscopy/Stuart04.pdf>.

Thompson, Robert C Ericson, Clayton Hartle Jennifer. Spectroscopic methods for detecting and identifying chelates. United States Patent Application Publication Pub. No. US 2006/0292698. 28 Desembre 2006. [En línia] [Data de consulta: 13 juliol 2015]. Disponible a: <https://www.google.ch/patents/US20060292698>.

Universidad del País Vasco. Espectroscopia infrarroja. [En línia] [Data de consulta: 11 setembre 2016]. Disponible a: <<http://www.ehu.eus/imacris/PIE06/web/IR.htm>>.

Yunarti, Rika Tri, Zulys, Agustino, Harahap, Lina Yuliana, Saroh, Mai, Pramukti, Ambar. "Effectiveness of Iron Fortification on Soy-Based Foods Using Ferrous Bisglycinate in the Presence of Phytic Acid." 1: 11–16. 2013. [En línia]. [Data de consulta: 23 octubre 2015]. Disponible a: <http://journal.ui.ac.id/index.php/science/article/view/1994/1523>.